

Aus dem Biologischen Institut der Keiô-Universität zu Yokohama

DIFFERENTIELLE FÄRBBARKEIT DER SOMATISCHEN  
UND MEIOTISCHEN METAPHASECHROMOSOMEN  
VON *CYPRIPEDIUM DEBILE* NACH DNase-BEHANDLUNG\*

Von

NORIKO YAMASAKI

Mit 16 Textabbildungen

(Eingegangen am 8. Juli 1960)

In vorhergehenden Mitteilungen (YAMASAKI 1956, 1959), ist gezeigt worden, daß somatische sowie erste meiotische Metaphasechromosomen von *Cypridium debile* durch eine von der Verfasserin ausgearbeitete Methode differentiell gefärbt werden können. Bei weiteren Studien über das Wesen dieser Färbungsdifferenzierung fand die Verfasserin, daß auch nach DNase-Behandlung mit anschließender Feulgen-Färbung die gleiche Erscheinung hervorzurufen war. Wenn bei dieser Behandlung auch die differentielle Färbung genau so ausfällt, wie nach den früher angewandten Methoden, so sei doch wegen der beachtenswerten Tatsache, daß Teile der Chromosomen durch DNase-Behandlung nicht verdaut werden, hier über die Methode und ihr Ergebnis berichtet.

Material und Methode

Das Versuchsmaterial war dasselbe wie in den vorangegangenen Untersuchungen. Als Kontrollmaterial wurden diesmal Wurzelspitzen von *Allium cepa* verwendet, weil sie im Vergleich mit *Cypridium debile* viel weniger Heterochromatin besitzen.

Die Wurzelspitzen und die Blütenknospen wurden in gleicher Weise behandelt: Fixierung in Eisessig-Alkohol (1:3) für 2 Std, sodann Übertragung in 75%igen Alkohol für 4 Std; während dieser Zeit muß der Alkohol 5mal erneuert werden. Nach Entwässerung erfolgt Einbettung in Paraffin; die 15  $\mu$  dick geschnittenen Paraffinserien von Versuchs- und Kontrollmaterial werden auf einem Objektträger parallel nebeneinander in 2 Reihen aufgeklebt; die Wurzelspitzen werden dabei nur längs geschnitten. Nach Paraffinlösung in Xylol wurden die Präparate durch Alkoholreihe (100-, 90-, 75- und 50%ig) in reines destilliertes Wasser überführt.

Die DNase-Lösung wurde folgenderweise hergestellt<sup>1</sup>: In 10 cm<sup>3</sup> eines Gemischs von 0,01 Mol KOH-Lösung und 0,001 Mol MgSO<sub>4</sub>-Lösung, die als Aktivator für das Enzym dient, und ein pH = 7,6 hat, wurde 20 mg DNase<sup>2</sup> gelöst. Das aus destilliertem Wasser herausgenommene und auf Filterpapier völlig getrocknete Präparat

\* Contributions from the Biological Institut, Keiô University, No. 23.

<sup>1</sup> Für die Hinweise auf die Methode der Herstellung und die Anwendung der DNase-Lösung danke ich Herrn Prof. N. SHINKE und Herrn Dr. M. ISHIDA der Universität Kyôto.

<sup>2</sup> Das vom „Washington Biochemical Laboratory“ hergestellte Enzym wurde verwendet.

wird mit dieser Mischung vorsichtig betropft, bis alle Schnitte damit bedeckt sind. Zur Kontrolle wurde die gleiche Mischung ohne DNase benutzt.

Derart behandelte Präparate wurden nach je 3-, 6-, 9-, 12- und 18stündigem Aufenthalt im Thermostat herausgenommen und nach schnellem Abspülen mit destilliertem Wasser nach Feulgen gefärbt.

### Befunde

Bei *Allium* wie auch *Cypripedium* zeigt sich die Wirkung der DNase schon nach 3—6stündiger Behandlung; längere Behandlungsdauer ergibt kein merklich anderes Resultat. Abb. 1 und 4 zeigen mitotische Metaphasechromosomen von *Allium* und *Cypripedium*, welche mit der Mischung ohne Enzym 9 Std lang behandelt wurden. In Gestalt und Färbbarkeit der Chromosomen zeigt sich nichts Ungewöhnliches.

Abb. 2 und 3 zeigen Metaphase- und Anaphasechromosomen von *Allium* nach 9stündiger DNase-Behandlung. Wie leicht ersichtlich, färbten sich die Chromosomen nicht mehr, wie es nach der Enzymwirkung zu erwarten war<sup>1</sup>. In Abb. 5—7 sieht man mitotische Chromosomen von *Cypripedium*. Die in Abb. 5 und 6 dargestellten Metaphase- bzw. Anaphasechromosomen waren 9 Std lang, die Chromosomen aus der Anaphasegruppe in Abb. 7 18 Std lang mit DNase behandelt. Im Gegensatz zu *Allium*, sind die Querstreifen, d. h. die heterochromatischen Chromosomenstücke<sup>2</sup>, stark gefärbt. Der allgemeine Zustand der Chromosomen bei DNase-Behandlung ist fast derselbe wie bei der früher verwandten Methode der Verfasserin (YAMASAKI 1956); nur ist die Chromosomengestalt in den Dauerpräparaten nach DNase-Behandlung viel besser erhalten, und die euchromatische Chromosomenteilteile sind gründlicher entfärbt.

Auch an den meiotischen Chromosomen konnte die gleiche Erscheinung wie in der Mitose festgestellt werden. Abb. 8 zeigt normal gefärbte Bivalente der ersten meiotischen Metaphaseplatte von *Cypripedium* aus dem Präparat, das mit der DNase-freien Mischung 18 Std lang behandelt wurde. Bei 3—18stündiger DNase-Behandlung tritt die differentielle Färbung hervor: Die Metaphase I in Abb. 9 zeigt den Färbungszustand nach 18stündiger Behandlung. Weil die Bivalente nicht auseinander-

<sup>1</sup> In Abb. 3 erkennt man, daß sich ein Chromosomenende (Pfeile) und Chromosomenteilteile dicht an der Nähe der Kinetochoren (Doppelpfeil) färben. Das erste besitzt nach KURITA (1958) und die letzteren nach LEVAN (1946) Heterochromatin. HEITZ hatte schon 1933 dieselbe Erscheinung an Telophase- und Prophasechromosomen wie auch selten an Metaphasechromosomen beobachtet. Über die nach DNase-Behandlung gewonnenen Ergebnisse bei *Allium* soll ein ausführlicherer Bericht in einer späteren Arbeit folgen.

<sup>2</sup> Der bisher von der Verfasserin benutzte Ausdruck „Querstreifen“ wird künftig durch den von HEITZ (1933) verwendeten Ausdruck „heterochromatisches Chromosomenstück“ ersetzt, um eine neue Terminologie zu vermeiden, da es jetzt fast unzweifelhaft ist, daß die „Querstreifen“ aus Heterochromatin bestehen.

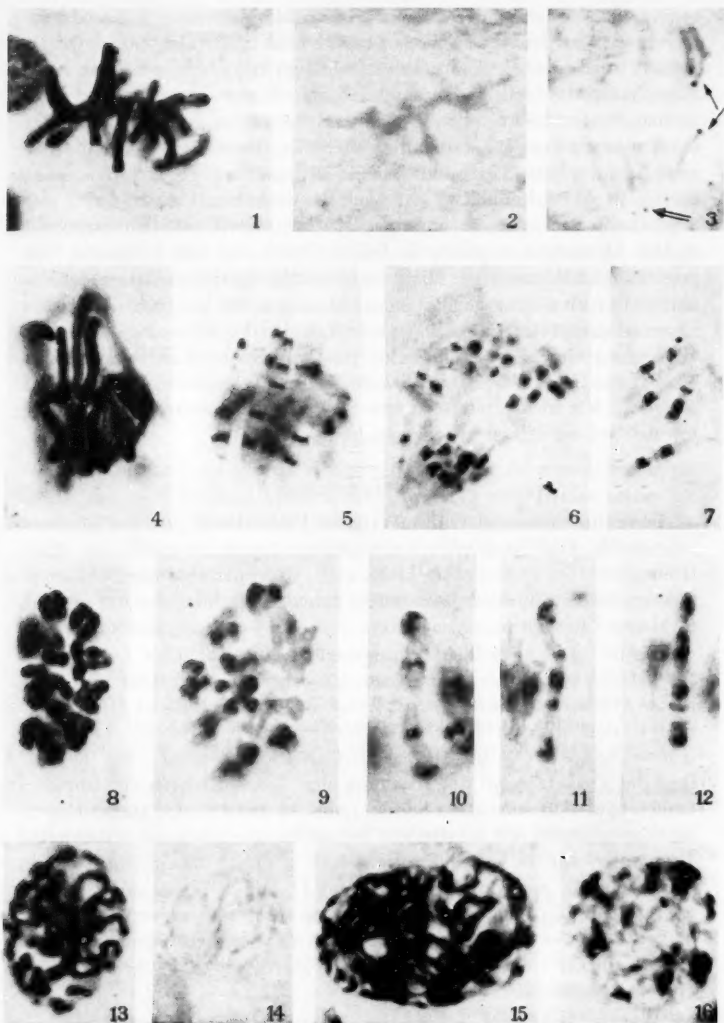


Abb. 1—16. Abb. 1—3. Somatische Chromosomen von *Allium cepa*. Abb. 4—7. Somatische Chromosomen von *Cyripedium debile*. Abb. 8—12. Bivalent in M—I von *Cyripedium debile*. Abb. 13 u. 14. Somatische Prophasekerne von *Allium cepa*. Abb. 15 u. 16. Somatische Prophasekerne von *Cyripedium debile*. (Abb. 1, 4, 8, 13 und 15: Kontrolle; Abb. 2, 3, 5—7, 9—12, 14 und 16: DNase-Behandlung.) Vergr. 1500  $\times$ . Erklärung im Text

gequetscht worden sind, ist die Färbungsdifferenzierung nicht so klar zu erkennen wie früher (YAMASAKI 1959). Daß die Bivalente differentiell gefärbt worden sind, ist aus Abb. 10, 11 und 12, welche am Rande der Metaphaseplatte getrennt liegende, terminal gepaarte Bivalente darstellen, deutlich festzustellen. Abb. 10 zeigt ein Bivalent, dessen Partnerchromosomen je zwei heterochromatische Zwischenstücke besitzen, und zwar eines am freien Ende und ein anderes ungefähr in der Chromosomenmitte. In Abb. 11 und 12 sieht man Bivalente aus Chromosomen mit 3 heterochromatischen Chromosomenstücken. Die Partnerchromosomen in Abb. 11 besitzen an jedem der beiden Enden, also dem freien und dem gepaarten Ende, und in der Mitte ein heterochromatisches Chromosomenstück. In Abb. 12 dagegen hat jedes Chromosom ein heterochromatisches Chromosomenstück am freien Ende und zwei in der Mitte, dagegen keines an dem terminal gepaarten Ende. Hinsichtlich der Konstanz in Zahl, Größe und Lage der heterochromatischen Chromosomenstücke ist das Ergebnis, wie nicht anders zu erwarten, genau dasselbe, wie es früher beschrieben worden ist (YAMASAKI 1959).

#### Schlußfolgerungen

Über die Ursache der differentiellen Färbbarkeit läßt sich eine abschließende Erklärung noch nicht geben. Durch Vergleich mit Kontrollmaterial ist es eindeutig klargelegt, daß entfärbte Chromosomenstücke euchromatisch sind. Demgemäß handelt es sich bei den differentiell färbbaren Chromosomenabschnitten um einen Fall von positiver Heterochromatie. Die auffälligen Chromozentren im Ruhekern entsprechen tief gefärbten Teilen der metaphasischen Chromosomen, aber nicht, wie SHAW (1959) bezüglich meiner früheren Untersuchungen (1956) vermutet, den nichtfärbbaren Abschnitten. Abb. 13 sowie 14 zeigen *Allium*- und Abb. 15 und 16 *Cypripedium*-Prophasekerne. Bei Behandlung der Präparate mit der Mischung ohne DNase färbten sich Chromonemen bzw. Chromozentren normal (Abb. 13 und 15). Im klaren Gegensatz dazu färbten sich bei den mit DNase-haltiger Mischung behandelten Präparaten nur die Chromozentren stark, dagegen die euchromatischen Chromonemen gar nicht, wie aus Abb. 14 und 16 ersichtlich ist. Die ausführliche Untersuchung des ganzen Kernteilungsverlaufs unter Verwendung der DNase-Behandlung<sup>1</sup> hat die Umwandlung der Chromozentren in die tiefgefärbten, also heterochromatischen Chromosomenstücke nachgewiesen.

Warum trotz der DNase-Behandlung Heterochromatin feulgen-positiv bleibt, ist eine schwer zu beantwortende Frage, die weiterer Untersuchung bedarf; denn sie bietet wenigstens einen konkreten An-

<sup>1</sup> Darüber soll ein Bericht in der nächsten Zukunft veröffentlicht werden.



haltspunkt für die Erfassung des Heterochromatins. Mit der gegenwärtig allgemein anerkannten Auffassung, es gebe eine große Menge von DNS in heterochromatischen Teilen des Chromosoms oder den Chromozentren des Kernes, scheint das Erhaltenbleiben der Färbbarkeit nach DNase-Behandlung unvereinbar zu sein, weil eine Wirkungsdauer von 18 Std genügt, um auch große Mengen von DNS enzymatisch abzubauen. Bei den gegenwärtigen Kenntnissen über Heterochromatin lassen sich nur recht unbestimmte Annahmen zur Erklärung der Nichtzerstörung der DNS in Heterochromatin machen; es könnte das Eindringen der DNase in die heterochromatischen Chromosomenstücke infolge besonderer Strukturverhältnisse, etwa einer impermeablen Hülle, verhindert werden; es könnte andererseits auf Grund eines stofflichen Unterschieds zwischen Eu- und Heterochromatin die DNS im letzteren anders gebunden sein, was ihre enzymatische Verdaulichkeit verhindert. Es müssen weitere Beobachtungen abgewartet werden zur Lösung dieses Problems.

#### Zusammenfassung

Mitotische und meiotische Metaphasechromosomen von *Cypripedium debile*, die nach Eisessig-Alkohol(1:3)-Fixierung mit DNase behandelt wurden, zeigten mittels der Feulgen-Reaktion dieselbe differentielle Färbung, welche durch die eine früher entwickelte Methode (YAMASAKI 1956, 1959) erzielt worden ist.

Die differentiell gefärbten Chromosomenabschnitte sind positiv heterochromatisch.

#### Literatur

- HEITZ, E.: Die Herkunft der Chromozentren. Dritter Beitrag zur Kenntnis der Beziehung zwischen Kernstruktur und qualitativer Verschiedenheit der Chromosomen in ihrer Längsrichtung. *Planta (Berl.)* **18**, 571—636 (1933).
- KURITA, M.: Heterochromaty in the *Allium*-chromosomes. Memoir of the Ehime University, Sect. II Science (Biology) (Matsuyama) **3**, 23—28 (1958).
- LEVAN, A.: Heterochromaty in chromosomes during their contraction phase. *Hereditas (Lund)* **32**, 449—468 (1946).
- SHAW, G.W.: The nature of differential reactivity in the heterochromatin of *Trillium* and *Paris* spp. *Cytologia (Tokyo)* **24**, 50—61 (1959).
- YAMASAKI, N.: Differentielle Färbung der somatischen Metaphasechromosomen von *Cypripedium debile*. *Chromosoma (Berl.)* **7**, 620—626 (1956). — Differentielle Färbung der Chromosomen der ersten meiotischen Metaphase von *Cypripedium debile*. *Chromosoma (Berl.)* **10**, 454—460 (1959).

Fräulein Dr. N.YAMASAKI,  
Biologisches Institut, Universität Keiō,  
Yokohama-Hiyoshi (Japan)

From the Department of Experimental Pathology, City of Hope Medical Center,  
Duarte, California

## SEX CHROMOSOMES AND MICROCHROMOSOMES OF *GALLUS DOMESTICUS*\*

By

SUSUMU OHNO\*\*

With 17 Figures in the Text

(Received August 1, 1960)

The utilization of improved cytological techniques in the study of avian cytology in general, and *Gallus domesticus* in particular, has resulted in the renewal rather than the resolution of old controversies. The recent attempt by NEWCOMER and BRANT (1954, 1957) to revive SOKOLOV's old proposal (1933) to downgrade microchromosomes to the status of supernumeraries has not been accepted by VAN BRINK who has done extensive studies on chromosomes of the class *Aves* (1956, 1959). Furthermore, the long-standing question of whether the female heterogamety of *Gallus domesticus* operates on the scheme of ZO or ZW remains unsettled.

During a previous study on somatic chromosomes of *Gallus domesticus*, the classical literature was re-examined. Some of the earlier studies made on sectioned materials were admirably accurate in their descriptions. The fact that the kinetochore loci were correctly identified by MILLER (1938) and by YAMASHINA (1944) on the first seven largest pairs of chromosomes is unmistakable tribute to the excellent quality of their work. It was felt that proposals made before the advent of combined hypotonic pretreatment and squashing should be re-evaluated. Accordingly, comprehensive studies were made on mitotic as well as meiotic figures of germ cells of both sexes.

### Materials and methods

Gonads were obtained from White Leghorn chickens of both sexes at various stages of embryonic and postnatal life.

Numerous mitotic figures of germ as well as somatic elements of the gonad were obtained from embryos in the ninth to twelfth days of incubation. There was no difficulty in distinguishing female from male embryos at this stage; in females, the left gonad, the future ovary, was already predominant. Feulgen squash preparations were made according to the procedure previously described for mammalian materials (OHNO, KAPLAN, and KINOSITA 1958). Detailed studies were made on five male and three female embryos.

\* This investigation was supported in part by research grant C-5138 from the National Cancer Institute, U.S. Public Health Service.

\*\* Frank L. Chance Research Fellow, City of Hope Medical Center.

Most of the oocytes obtained from three female chicks sacrificed on the day of hatching were already in the interphase-like dictyotene stage. Abundant pachytene and diplotene figures of oocytes were recovered from ovaries of five embryos in the nineteenth and twentieth days of incubation. To obtain satisfactory squash preparations, pieces of ovary were immersed in 10 per cent trypsin solution for 10 minutes at 37° C. before they were fixed and squashed, a modification previously found useful for similar studies of *Rattus norvegicus* (OHNO, KAPLAN, and KINOSITA 1960c, in press). In all other cases, the usual hypotonic pretreatment was utilized.

Meiotic figures of the homogametic male sex were obtained from testes of two five-month-old roosters.

### Observations

#### *A. Mitotic figures of germ and somatic elements in embryonic gonads*

Squash preparations obtained from gonads of both male and female embryos in the ninth to twelfth days of incubation yielded abundant mitotic figures.

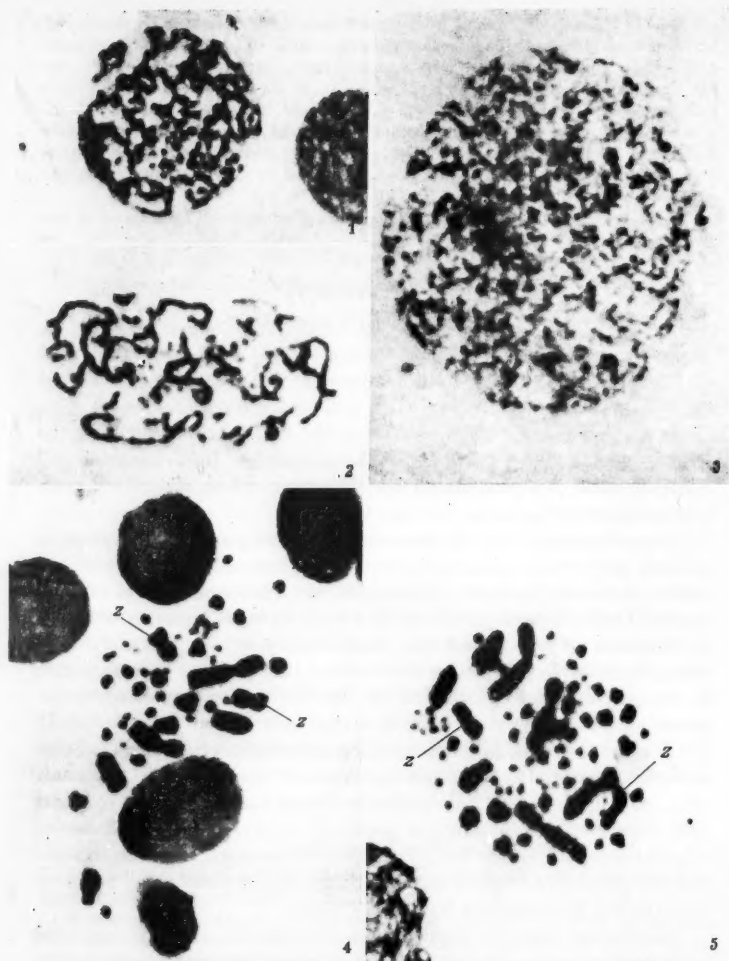
In the left gonads of the females at the earlier prophase stages, the large oögonial nuclei were easily distinguishable from follicular cell nuclei because of a pronounced size difference, which diminished completely at prometaphase.

In male gonads, even at the earliest stage of prophase, however, no definite distinction could be made between spermatogonial nuclei and nuclei of somatic elements. Among 40 early prophase figures of good quality obtained from gonads of five male embryos, none contained a chromosome of substantial size which was positively heteropycnotic along its entire length. It became evident that positive heteropycnosis is not characteristic of either of the two Z-chromosomes of spermatogonia, or of the somatic elements of the male gonad (Figs. 1 and 2).

Of eight early prophase figures of oögonia obtained from three females, none demonstrated positive heteropycnosis of the single Z-chromosome (Fig. 3). On the other hand, among 25 prophase figures of follicular cells examined, 12 contained a positively heteropycnotic chromosome of a characteristic size at the periphery of the nucleus. This chromosome was identified as a single Z in the earlier study on female skin and liver cells (OHNO, KAPLAN, and KINOSITA 1960a).

NEWCOMER recently implied that microchromosomes do not exist as individual entities at early mitotic prophase, but rather aggregate to form positively heteropycnotic masses (1957). Contrary to this view, microchromosomes were clearly recognized as such in each mitotic prophase nucleus from embryonic gonads, and they were never positively heteropycnotic (Figs. 1, 2, and 3).

Aside from the large chromocenter representing a single Z which occurred exclusively in female somatic cells, somatic interphase nuclei



Figs. 1—5<sup>1</sup>. Figs. 1 and 2. Early and late mitotic prophase figures of the male. Fig. 3. Early prophase figures of an oögonium. Fig. 4. Full metaphase figure of the male disrupted during squashing. Fig. 5. Prometaphase figure of a male in which 78 chromosomes have been counted

<sup>1</sup> All photomicrographs were taken by Leitz Panphot. Magnification in reproduction is  $\times 2200$ . Figs. 1—10 are from male and female gonads of chick embryos at the ninth day of incubation. Figs. 11—16 are from testes of sexually mature roosters. Fig. 17 is from the ovary of a chick embryo in the nineteenth day of incubation. (Z indicates the Z-chromosome; ZZ indicates the ZZ-bivalent.)

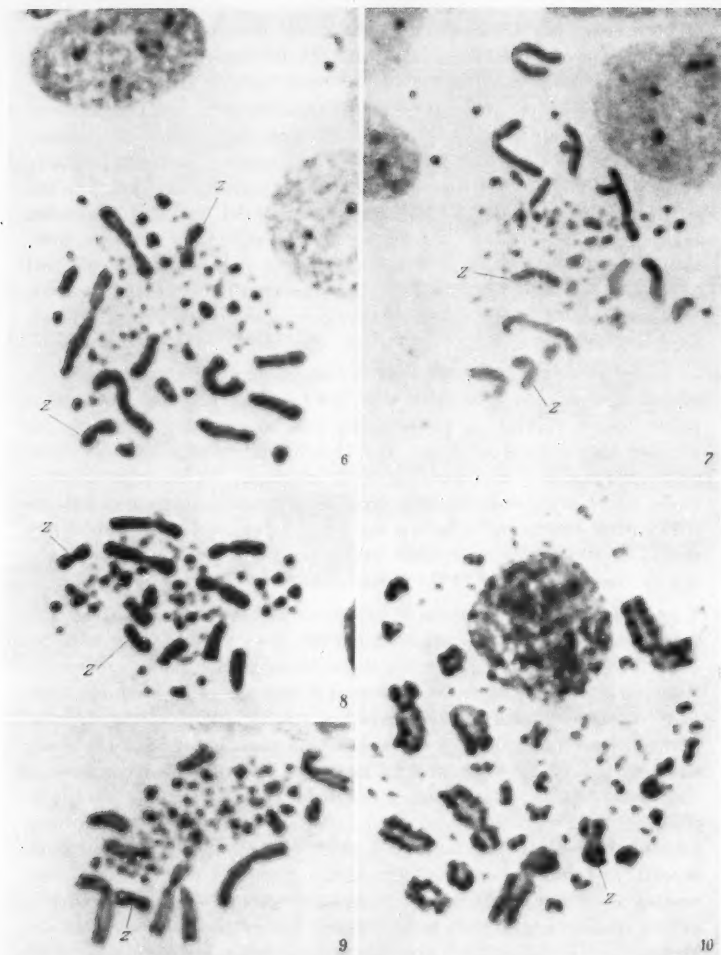
of both sexes often contained several small but conspicuous chromocenters. They appeared to represent the heterochromatic regions of autosomes belonging to the macrochromosome group.

The chromosome complex of *Gallus domesticus* is said to consist of a specific number of macrochromosomes and numerous microchromosomes. The term "macrochromosome", however, is somewhat misleading, as the largest element of this species corresponds in size to the medium-sized chromosomes of *Rattus norvegicus* or *Mus musculus*. Furthermore, agreement has not been reached as to their exact number; anywhere from the first six to eight largest pairs have been considered by various authors (MILLER 1938, NEWCOMER 1957, VAN BRINK 1959, YAMASHINA 1944). Some of the smaller chromosomes, on the other hand, approach the limit of the resolution obtainable by light microscope.

When a chromosome complement containing a large number of such minute elements must be dealt with, only a small portion of the metaphase figures present in preparations can be considered suitable for detailed karyological analysis. The chromosome complement must be well-scattered and exceptionally well-flattened. In many metaphase nuclei which are unsatisfactorily fixed, microchromosomes may become sticky, thus appearing to have a tendency to aggregate. This tendency should be considered an artifact rather than a feature in favor of the sub-chromosome nature of the chromosomes.

Although the combination of hypotonic pretreatment and squashing possesses many decisive advantages over the old sectioning method, one inherent disadvantage is the disruption of cells during squashing, resulting in the displacement of several chromosomes far from the main body of the nucleus. The chance of low scoring of diploid chromosome numbers due to this hazard was considered great for the present study since all analyzable cells were of necessity flattened to the extent of disruption. A good illustration is the male metaphase nucleus in Fig. 4. Although this nucleus is well fixed and flattened, three macrochromosomes have plainly been excluded, since it is monosomic for the first, second, and fourth largest pairs. If the displaced chromosomes were smaller members of the microchromosome group, however, a nucleus of this quality might have been selected for detailed karyological analysis.

Prometaphase figures were found better suited than full metaphase figures for exact counting of total chromosome numbers. As the chromosomes attained the maximum degree of contraction at full metaphase, smaller members of the microchromosome group became almost indistinguishable (Figs. 8 and 9). Even the smallest of microchromosomes of prometaphase, on the other hand, were large enough to permit ready recognition.



Figs. 6—10. Figs. 6 and 7. Prometaphase figures of the same male as in Fig. 5 in which further chromosome counts of 74 and 77 were obtained. Figs. 8 and 9. Full metaphase figures of the male and the female. Fig. 10. Metaphase figure of the female in which each chromosome exists as two sister chromatids. One microchromosome at the center demonstrates a medially-located kinetochore. The homologue of this chromosome is overlapped by an interphase nucleus

Excluding those nuclei with obvious technical artifacts, exact chromosome counts were attempted on 28 prometaphase figures of both sexes. Figs. 5, 6, and 7 illustrate the quality of figures used. Among

the 14 male nuclei, the lowest number scored was 68 and the highest was 78. The numbers of nine cells were within the range of 74 to 78. Of the 14 female nuclei, the lowest was 69 and the highest was 77 (see Table). The exact location of kinetochores on the larger chromosomes was readily determined on full metaphase figures.

Table: Diploid chromosome number in 14 male and 14 female cells

♂	68 68			71	72	73	74 74		76 76	77 77 77	78 78
♀		69 69	70		72	73 73	74 74	75	76 76 76	77	

Comparing the male and female cells of Figs. 8 and 9, it may be noted that the first and second largest pairs are metacentric chromosomes, their short arms being slightly longer than one-half the length of their long arms. It is of historical interest to recall that the largest metacentric element had once been regarded as the sex chromosome on the basis of incorrect observations, which indicated that it is represented only once in the diploid complement of the heterogametic female sex (HANCE 1923, WHITE 1932). The third largest pair has its kinetochore extremely close to the terminal end, while the fourth exhibits a distinct, short second arm.

It is the fifth largest element having a medially-located kinetochore which exists as a pair in the homogametic male sex and singly in the female, as originally described by SUZUKI in 1930. Since this is the only mediocentric element in the complement, the sex of individuals of this species can be correctly identified at once in well-prepared metaphase figures. The sixth, seventh, and eighth are obviously acrocentric chromosomes. The rest usually appear as dots of various sizes. There were, however, several full metaphase figures in which even the smaller members of the microchromosome group were observed as two sister chromatids held together at the kinetochore locus. In such a nucleus, it was possible to recognize at least one pair of mediocentrics and two pairs of metacentrics among the microchromosomes (Fig. 10). It is incorrect to assume that all the microchromosomes have terminally-located kinetochores.

#### *B. Male meiosis in adult testes*

Spermatocyte nuclei in the stage preceding pachytene were impossible to analyze, even when well-flattened, and were therefore excluded from observation.

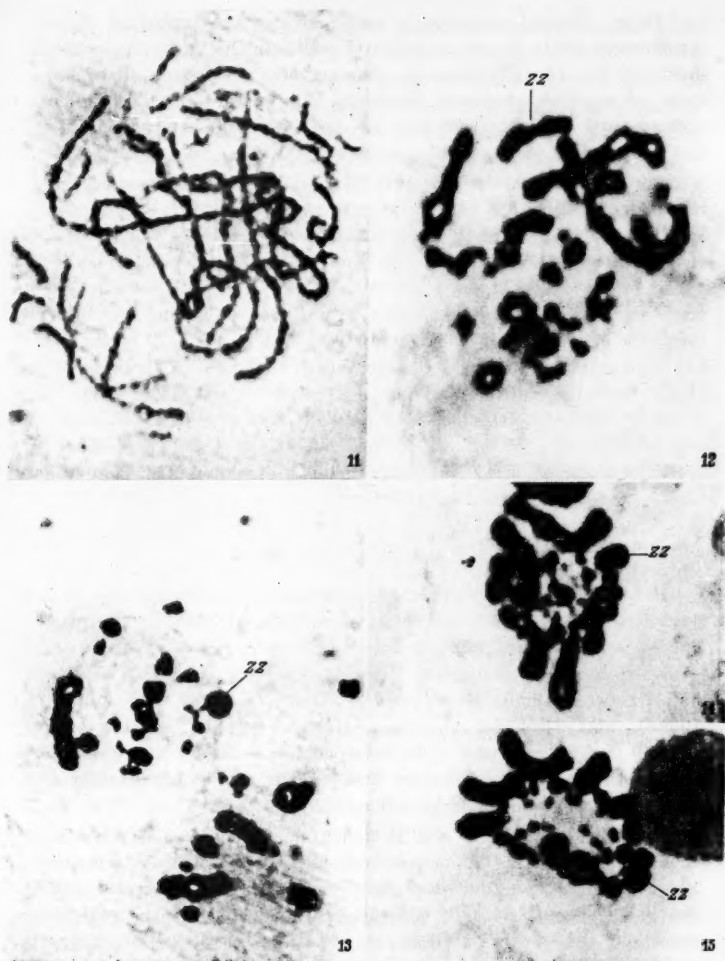


Although individual characteristics of all bivalents could not be clearly discerned in several hundred male pachytene nuclei examined, not a single nucleus was seen in which the fifth largest bivalent, the ZZ-bivalent, demonstrated the slightest sign of precocious condensation (Fig. 11).

At diplotene, there appeared to be the normal rate of chiasma formation between two Z-chromosomes (Fig. 12). The fifth largest bivalent exhibited four or five chiasmata. The first and second bivalents, which were at least twice the size of the ZZ-bivalent, had eight to ten chiasmata; and the third and fourth bivalents had six. Pronounced terminalization of chiasmata appeared to occur selectively on the fourth and fifth largest bivalents, which at diakinesis (Fig. 13) and first metaphase (Figs. 14 and 15), almost invariably assumed an 0-shape or occasionally a figure-8-shape. The largest bivalent, on the contrary, did not show any effect of terminalization. As a result, if observation were limited to diakinesis and first metaphase, a false impression would be received of the rate of chiasma formation, which would appear high in the largest and low in the fourth and fifth largest bivalents. This might have caused NEWCOMER's reluctance to recognize the fifth largest bivalent as the ZZ. It had been thought that the unusually high rate of genetic crossing-over known to occur between the sex-linked genes of this species could only result from a ZZ-bivalent showing an equally high rate of chiasma formation. From this point of view, the largest bivalent is better qualified than the fifth largest to be the ZZ (NEWCOMER and BRANT 1954).

Our previous investigations (1960c, in press) on meiosis of the heterogametic female sex of *Rattus norvegicus* revealed that the XX-bivalent of oöcytes, in sharp contrast to the XY-bivalent of the male, behaves in the same way as the autosomal bivalents. SLIZYNSKI has also described the isopycnotic behavior of the XX-bivalent in *Mus musculus* (1957). These findings on mammals and the present finding on *Gallus domesticus* appear to indicate that regardless of which sex is homogametic, the homozygous sex bivalent does not display any of the allocyclic behavior so commonly associated with sex chromosomes in meiosis. After observing male meiotic figures of this species, NEWCOMER and BRANT (1954) concluded that microchromosomes originated from heterochromatic masses associated with euchromatin during meiotic prophase.

They state, "In the preprophase primary spermatocyte, heterochromatic masses are conspicuous in the nucleus. They progressively condense throughout zygotene and pachytene, becoming localized among the chromosomes or in groups, often obscuring the chromosome relationships. These positively heteropycnotic bodies can still be observed associated with the chromosomes throughout pachytene and diplotene but gradually condense and often coalesce with the onset of dia-



Figs. 11—15. Fig. 11. Pachytene nucleus of the male. Figs. 12 and 13. Diplotene and diakinesis figures of the male. Figs. 14 and 15. First meiotic metaphase of the male

kinesis into a variable number of chromosome-like structures frequently with apparent chiasma formation."

Contrary to this description, even the smallest members of the microchromosome group were recognized as individual bivalents at

pachytene. Several exceedingly small bivalents of apparent micro-chromosome origin appear as separate bodies in the pachytene nucleus shown in Fig. 11. Furthermore, chromomeric patterns as distinct as those of macrochromosomal bivalents can be recognized on micro-chromosomal bivalents, and they are not positively heteropycnotic at this or any other stage of either meiosis or mitosis.

In a diplotene nucleus in Fig. 12, at least 18 bivalents demonstrating characteristic diplotene configurations can be discerned, despite overlappings. Although each bivalent assumed more definite contours as it condensed at diakinesis, this stage was not suitable for determination of the haploid chromosome number (Fig. 13). Ten first meiotic metaphase figures of analyzable quality were found. Allowing for slightly arbitrary judgement in identification of a few smaller tetrads, the haploid number of 39 was ascribable to each of the ten (Figs. 14 and 15). Many second meiotic metaphase figures were also analyzable. In 20 nuclei critically examined, the haploid number ranged between 35 and 39 (Fig. 16). MILLER, observing first meiotic metaphase figures of spermatocytes, concluded that 40 is the most likely haploid chromosome number for *Gallus domesticus* (1938).

#### C. Female meiosis in embryonic ovaries

Many oöcytes from female embryos in the nineteenth day of incubation were in pachytene stage of meiosis. These figures did not appear to differ from male pachytene figures, in sharp contrast to the situation found in mammals. In *Rattus norvegicus* (OHNO, KAPLAN, and KINOSITA 1958), *Mus musculus* (OHNO, KAPLAN, and KINOSITA 1959a), and *Didelphis virginiana* (OHNO, KAPLAN, and KINOSITA 1960b), pachytene figures of the heterogametic male sex were characterized by the peculiar morphology and location of the XY-bivalent and were easily distinguishable from females.

However, when only well-flattened pachytene nuclei were dealt with, as shown in Fig. 17, one positively heteropycnotic body corresponding well in size to a condensed Z-chromosome was consistently singled out in every nucleus. The difficulty in distinguishing the pachytene nucleus of the heterogametic female sex from that of the homogametic male sex appears due not to the lack of precocious condensation exhibited by the Z of the heterogametic sex, but is due rather to the relatively small size of this chromosome, plus the fact that the Z is not located at the periphery of the nucleus apart from the autosomal bivalents, as in the XY-bivalent of mammals.

The left gonad of female embryos on the twentieth day of incubation contained oöcytes in both pachytene and diplotene stages. The diplotene bivalents were so fine and elongated and thoroughly intertwined that

it was impossible to distinguish a positively heteropycnotic body presumably representing the Z in any of the nuclei examined.

After completing up to diplotene stage of meiosis, oöcytes enter the long interphase-like dictyotene stage, where they remain until shortly before ovulation, which happens only after sexual maturity has been reached. The recovery of oöcytes in diakinesis and first meiotic metaphase from ovaries of adult hens was found to be an almost impossible

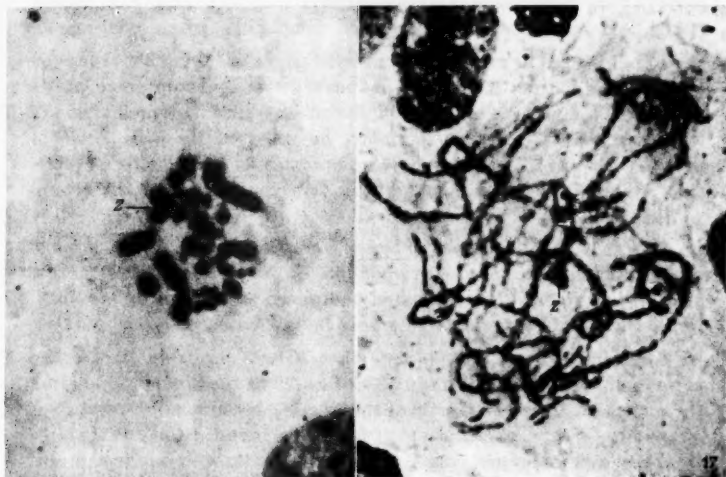


Fig. 16 and 17. Fig. 16. Second meiotic metaphase of the male. Fig. 17. Pachytene nucleus of the female

task. The question of whether the Z of the heterogametic sex exists singly or in the form of the ZW-bivalent was not answered during the present study.

#### Discussion

Newly available information concerning the chromosome complex of *Gallus domesticus* has shown that many of the conclusions reached by early investigators were faulty. Several studies made on sectioned materials in the 1930's and 1940's, however, still excite admiration for their technical excellence, as evidenced by their illustrations. All the important karyological features of this species were described before the advent of techniques combining hypotonic pretreatment and squashing. It may be that for the avian species, the sectioning technique is better for determining chromosome numbers than the techniques now employed, as the displacement of a few chromosomes from the main body of the nucleus is unavoidable in making squash preparations.

The first cytologically correct confirmation of the female heterogamety of this species should be credited to SUZUKI, who singled out as the Z-chromosome the fifth largest element having a medially-located kinetochore (1930). Many subsequent investigators confirmed this finding, such as SOKOLOW and TROFIMOW (1933), UNGER (1936), SOKOLOW, TINIAKOW, and TROFIMOW (1936), MILLER (1938), OGUMA (1938), YAMASHINA (1944), MATTHEY (1950), NEWCOMER and BRANT (1954), VAN BRINK and UBBELS (1956), MATTHEY and VAN BRINK (1957), and VAN BRINK (1959).

Standing out from all these investigations is MILLER's study on a sex-reversed hen (1938). He showed that the Z-chromosome passes undivided to one pole of the spindle at the first meiotic division of the heterogametic sex. Furthermore, he reported that the Z is not paired with any of the smaller chromosomes on the equatorial plate, thus favoring the ZO, rather than the ZW, constitution for the heterogametic sex.

Although HANCE appears to be the first who recognized the chromosome nature of the minute granule-like elements (1923, 1924, 1926a, 1926b), he greatly underestimated the number of microchromosomes, for he suggested 40 as the largest possible diploid chromosome number.

Coinciding with MILLER's view that 40 was probably the haploid chromosome number, OGUMA in 1938 fixed 78 as the diploid number for the male and 77 for the female of this species, a claim substantiated by YAMASHINA's extensive study in 1944. These investigators also favored the ZO sex chromosome constitution for the heterogametic female sex. Without denying the quality of the Japanese school's observations, MATTHEY in 1948 expressed his belief that the exact determination of the diploid chromosome number of this species may be beyond the possibilities of present cytological techniques. VAN BRINK, utilizing the combination of hypotonic pretreatment and squashing, reported in 1956 and 1959 that study of 20 mitotic metaphases showed that the diploid chromosome number of the female varied from 67 to 82, and that of the male from 68 to 81. It should be emphasized that neither MATTHEY nor VAN BRINK were implying that microchromosomes are numerically variable but that their exact determination is a difficult technical problem.

On the other hand, NEWCOMER and BRANT in 1954 attempted to classify all but the first six largest pairs of this species as numerically variable accessory or supernumerary chromosomes. According to them, microchromosomes do not exist as individual entities during interphase and prophase of mitosis or meiosis; instead, they are represented as positively heteropycnotic masses.

Present investigations on mitotic figures from male and female embryonic gonads confirmed earlier findings on skin and liver cells, in which it was noted that from the very early stage of prophase, microchromosomes were individually recognizable and did not contribute to the formation of interphase chromocenters. Furthermore, during pachytene of meiosis, microchromosomes of both sexes were clearly recognized as individual bivalents possessing definite chromomeric patterns. Although aggregates of microchromosomes were seen in some poorly fixed and insufficiently flattened mitotic prophases as well as pachytene nuclei, they never showed positive heteropycnosis at any stage of mitosis or meiosis and were obviously technical artifacts. It may be that NEWCOMER and BRANT were unduly influenced by presently available genetic data which credits this species with only six known linkage groups.

As to the exact diploid chromosome number for the male and female of this species, 28 counts made on well-prepared prometaphase and metaphase figures of both sexes varied only from 68 to 78. Further, in first meiotic metaphase figures of the male, a count of 39 was obtainable on all ten cells examined.

While agreeing with MATTHEY's and VAN BRINK's contention that the exact determination of the chromosome number of this species is presently impossible, the author is inclined to take the stand that *Gallus domesticus* has a fixed chromosome number somewhere in the upper 70's.

Based on our findings on male and female meiotic figures of *Rattus norvegicus* (1960c), it has been proposed that positive heteropycnosis, which occurs exclusively in the XY-bivalent of the heterogametic male sex and not in the female XX-bivalent, may be the direct consequence of the mechanism by which the X and the Y are kept in isolation from each other. The prevention of free crossing-over between these two bodies is the necessary prerequisite for the gradual accumulation of factors governing the development of one sex on the one but not on the other.

Applying this proposal to the class *Aves*, positive heteropycnosis during meiosis is expected of the Z of the heterogametic female but not of the ZZ-bivalent of the homogametic male. Present findings on male meiotic figures of *Gallus domesticus* have, indeed, shown that the fifth largest bivalent, the ZZ, behaves the same as the autosomal bivalents throughout the entire process of meiosis. Apparently chiasma formation is not restricted in any way between the two Z-chromosomes of spermatocytes.

The Z-chromosomes in pachytene nuclei of oocytes, on the other hand, did not stand out from the autosomal bivalents as conspicuously

as did the mammalian XY-bivalent in spermatocyte nuclei at the corresponding stage. This inconspicuousness, however, appeared attributable not to the lack of positive heteropycnosis, but rather to the relatively small size of the Z, plus the fact that unlike the XY of mammals, its location is not fixed at the periphery of the nucleus apart from the autosomal bivalents. Indeed, a positively heteropycnotic body corresponding well in size to the Z in a condensed state was recognizable in each well-flattened pachytene nucleus of the female.

At subsequent diplotene, however, a corresponding body was not recognized as an individual entity in any of the nuclei examined. Diplotene nuclei of oocytes were hard to analyze because the elongated bivalents tended to intertwine; thus, this negative finding may not necessarily indicate a complete lack of positive heteropycnosis in the Z of this stage. Positive heteropycnosis may not be a firmly fixed feature of the Z during meiosis of the heterogametic sex, as it is of the XY of mammals. This could reflect the existence of the Z as a univalent having no need for isolation from the W.

Ontogeny of *Gallus domesticus* has been far more thoroughly studied than that of any species of mammals. In 1904, HOLLANDER first remarked on the phenomenon of all oocytes completing up to diplotene stage of meiosis while females are in late embryonic or early postnatal life.

Among sex chromosomes of mammalian somatic cells, positive heteropycnosis characterized only one of the two X's of the female and not the X of the male (OHNO and HAUSCHKA 1960). This dualistic behavior pattern exhibited by X-chromosomes apparently causes the distinct nuclear sex difference in morphology of mammalian somatic nuclei as originally described by BARR and BERTRAM in 1949.

A similar type of nuclear sex difference due to the exclusive occurrence of a sex chromatin body in somatic nuclei of the heterogametic female sex has been reported in *Gallus domesticus* by KOSIN and ISHIZAKI (1959). Our subsequent studies on skin and liver cells showed that the sex chromatin represents the single Z-chromosome in positive heteropycnosis (1960a).

Neither of the two Z's in the homogametic male sex, on the other hand, demonstrates this condensation. The single Z in somatic elements of female gonads did not display positive heteropycnosis as persistently as it did in female skin and liver cells. Furthermore, a single Z of oogonia showed no sign of positive heteropycnosis.

#### Conclusions and Summary

Chromosomes of both sexes of *Gallus domesticus* were studied at various stages of mitosis and meiosis.

1. During meiotic prophase, the fifth largest bivalent of the homogametic male sex, the ZZ-bivalent, behaved in the same way as the



autosomal bivalents of similar size, demonstrating a normal rate of chiasma formation during diplotene. In male somatic cells, too, both of the two Z's always remained isopycnotic to the autosomes.

2. The phenomenon of all the oöcytes of females completing up to diplotene stage of meiosis in late embryonic or early postnatal life occurred in this species of the class *Aves*. This phenomenon is not the exclusive property of the class *Mammalia*.

3. The Z of the heterogametic female sex did not display the persistent positive heteropycnosis seen in the XY-bivalent of mammals during meiosis, which may reflect the existence of the Z as a univalent. The single Z in somatic elements of the female gonad, unlike that in female skin and liver cells, showed positive heteropycnosis in only half of the prophase nuclei examined.

4. Even smaller members of the microchromosome group retained their individuality throughout the entire process of mitosis as well as meiosis. Furthermore, distinct chromomeric patterns were observed on microchromosomal bivalents at pachytene, and positive heteropycnosis did not occur at any stage of mitosis or meiosis.

5. On the basis of counts made on well-prepared mitotic prometaphase and first meiotic metaphase figures, the author favors the view that *Gallus domesticus* has a fixed diploid chromosome number in the upper 70's. Earlier Japanese investigators may yet be proven correct in having fixed the diploid chromosome number for the male at 78.

#### References

- BARR, M. L., and E. G. BERTRAM: A morphological distinction between neurons of the male and female, and the behavior of the nucleolar satellite during accelerated nucleoprotein synthesis. *Nature (Lond.)* **163**, 676—677 (1949).
- BRINK, J. M. VAN: L'Expression morphologique de la digamétie chez les Sauropsidés et les Monotrèmes. *Chromosoma (Berl.)* **10**, 1—71 (1959).
- , and G. A. UBBELS: La question des hétérochromosomes chez les Sauropsidés. *Oiseaux. Experientia (Basel)* **12**, 162—164 (1956).
- HANCE, R. T.: Chick chromosomes and sex determination. *Anat. Rec.* **26**, 348 (1923). — The somatic chromosomes of the chick and their possible sex relations. *Science* **59**, 424—425 (1924). — The chromosomes of the chick soma. *Biol. Bull.* **51**, 443—449 (1926a). — Sex and the chromosomes in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *J. Morph.* **43**, 119—145 (1926b).
- KOSIN, I. L., and H. ISHIZAKI: Incidence of sex chromatin in *Gallus domesticus*. *Science* **130**, 43—44 (1959).
- MATTHEY, R.: Les chromosomes des Oiseaux. In P. GRASSÉ, *Traité de zoologie*, XV, Oiseaux, Paris 1950.
- , and J. M. VAN BRINK: Sex chromosomes in *Amniota*. *Evolution* **11**, 163—165 (1957).
- MILLER, R. A.: Spermatogenesis in a sex-reversed female and in normal males of the domestic fowl, *Gallus domesticus*. *Anat. Rec.* **70**, 155—189 (1938).
- NEWCOMER, E. H.: The mitotic chromosomes of the domestic fowl. *J. Hered.* **48**, 227—234 (1957).
- , and J. W. A. BRANT: Spermatogenesis in the domestic fowl. *J. Hered.* **45**, 79—87 (1954).

- OGUMA, K.: Studies on sauropsid chromosomes. V. The karyotypes of the quail and the duck, different from those reported by previous authors. *Ann. zool. jap.* **17**, 612—622 (1938).
- OHNO, S., and T. S. HAUSCHKA: Allocyclus of the X-chromosome in tumors and normal tissues. *Cancer Res.* **20**, 541—545 (1960).
- W. D. KAPLAN and R. KINOSITA: A photomicrographic representation of mitosis and meiosis in the male of *Rattus norvegicus*. *Cytologia* (Tokyo) **23**, 422—428 (1958). — On the end-to-end association of the X and Y-chromosomes of *Mus musculus*. *Exp. Cell Res.* **18**, 282—290 (1959a). — Formation of the sex chromatin by a single X-chromosome in liver cells of *Rattus norvegicus*. *Exp. Cell Res.* **18**, 415—418 (1959b). — On the sex chromatin of *Gallus domesticus*. *Exp. Cell Res.* **19**, 180—183 (1960a). — Basis of nuclear sex difference in somatic cells of the opossum, *Didelphis virginiana*. *Exp. Cell Res.* **19**, 417—420 (1960b). — On isopycnotic behavior of the XX-bivalent in oocytes of *Rattus norvegicus*. *Exp. Cell Res.* **19**, 637—639 (1960c). — X-chromosome behavior in ovarian germ and somatic cells in *Rattus norvegicus*. *Exp. Cell Res.* (in press).
- SLIZYNSKI, B. M.: Meiotic prophase in female mice. *Nature* (Lond.) **179**, 638 (1957).
- SOKOLOV, N. N., G. G. TINIAKOW and J. E. TROFIMOW: On the morphology of the chromosomes in *Gallinaceae*. *Cytologia* (Tokyo) **7**, 466—689 (1936).
- , u. J. E. TROFIMOW: Individualität der Chromosomen und Geschlechtsbestimmung beim Haushuhn (*Gallus domesticus*). *Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre* **65**, 327—352 (1933).
- SUZUKI, K.: On the chromosomes of the domestic fowl (in Japanese). *Zool. Mag.* **42**, 358—362 (1930).
- UNGER, H.: Beitrag zur Chromosomenforschung der Vögel. *Z. Zellforsch.* **25**, 476—500 (1936).
- WHITE, M. J. D.: The chromosomes of the domestic fowl. *J. Genet.* **26**, 345—350 (1932).
- YAMASHINA, Y.: Karyotype studies in birds. I. Comparative morphology of chromosomes in seventeen races of domestic fowls. *Cytologia* (Tokyo) **13**, 270—296 (1944).

SUSUMU OHNO, D.V.M., Ph. D.

Department of Experimental Pathology, City of Hope Medical Center  
Duarte, California, U.S.A.

Committee on Biophysics, University of Chicago

CHROMOSOME BEHAVIOR IN SPERMATOGENESIS  
OF CECIDOMYIIDAE (DIPTERA)

By

IRENE GEYER-DUSZYŃSKA\*

With 30 Figures in the Text

(Received August 8, 1960)

The course of spermatogenesis in *Cecidomyiidae* has been described by KRACZKIEWICZ (1938, 1950) and WHITE (1946, 1947, 1950, 1954) on the basis of observations collected in numerous species. One of the most characteristic features of this highly peculiar spermatogenesis is the complete absence of pairing of chromosomes at any stage. In the prophase of the first meiotic division the undivided chromosomes are segregated into two groups: (1) a group composed of all E chromosomes (chromosomes present in germ cells during the entire life cycle and eliminated from somatic cells in the early cleavage divisions) plus one haploid set of S chromosomes (chromosomes present in both germ cells and somatic cells during the entire life cycle), and (2) a group consisting only of one haploid set of S chromosomes. This peculiar segregation is followed by the disappearance of the nuclear membrane and then directly by anaphase movement. In telophase an unequal cytokinesis takes place and two categories of second spermatocytes are formed. The second meiotic division occurs only in the small spermatocytes and only this element will give rise to mature sperms.

The interpretations of first meiotic division offered by KRACZKIEWICZ in his later paper and by WHITE in his earlier papers were similar. Both authors claimed that this division should be regarded as unipolar mitosis. The spindle was described as cone-shaped with only one pole present. The haploid set of S chromosomes pass up the spindle toward this pole. The remaining chromosomes lie passively at the base of the cone. The migration of the haploid set of S chromosomes is accompanied by the elongation of the unipolar spindle. In his later papers (1950) 1954), WHITE, mainly on the basis of his observations of the first meiotic division in *Monarthropalpus buxi*, states that probably in all *Cecidomyiidae* species the spindles occurring in this division should be described as bipolar. However, the nature of the two poles is quite different; one of

\* This work was performed under a fellowship of the Rockefeller Foundation while the author was on leave of absence from Warsaw University Department of Cytology. The research was partially supported by the Abbott Research Fund of the University of Chicago.

the poles may be described as "active" and the other as "diffuse", or "passive". The haploid set of S chromosomes destined to pass to the functional spermatocyte migrates towards the active pole, the remaining chromosomes are left on the passive pole.

Despite the fact that the first meiotic division in the male has been described in many *Cecidomyiidae* species, the available data do not permit a decision as to which interpretation is correct. The present work constitutes an attempt to elucidate the true nature of the first spermatocyte division in *Cecidomyiidae*.

### Material and Methods

The investigations were carried out on *Rhabdophaga batatas* WALSH. This species appears on the branches of low swamp willows and produces ball-shaped or ovoid galls about 1–1.5 cm in diameter. The material was collected in the vicinity of Chicago and designated as *R. batatas*, according to the classification of FELT (1906, 1908, 1915, 1917). Testes of male larvae, pupae, and adults were dissected out in 0.5 per cent dextrose solution and squashed. The squashes were sealed with vaseline and investigated under a phase contrast microscope. A Galileo  $\times 100$  immers. objective and periplan Leitz  $\times 8$  ocular were used. Photos were taken by a Leitz camera. In such squashes all the mitotic activity of the cells is stopped, but the cells do not show any sign of deformations. The mitotic spindles, if present, remain intact for several hours.

Observations of spermatogonial divisions and the first meiotic division in polarized light were made according to the method developed by TAYLOR (1959)<sup>1</sup>. Occasionally testes were dissected out in 0.67 per cent NaCl solution and aceto-carmin squashes were made and investigated under the phase contrast microscope.

Some additional evidence was obtained from another cecidomyiid species, *Wachtliella persicariae* L. occurring on the leaves of *Polygonum amphibium* L. forma *terrestre*. Material was collected in Poland, in the vicinity of Warsaw. Larvae and pupae were fixed in Bouin-Allen and embedded in paraffin. Sections were stained with Heidenhain's iron hematoxylin.

### Results

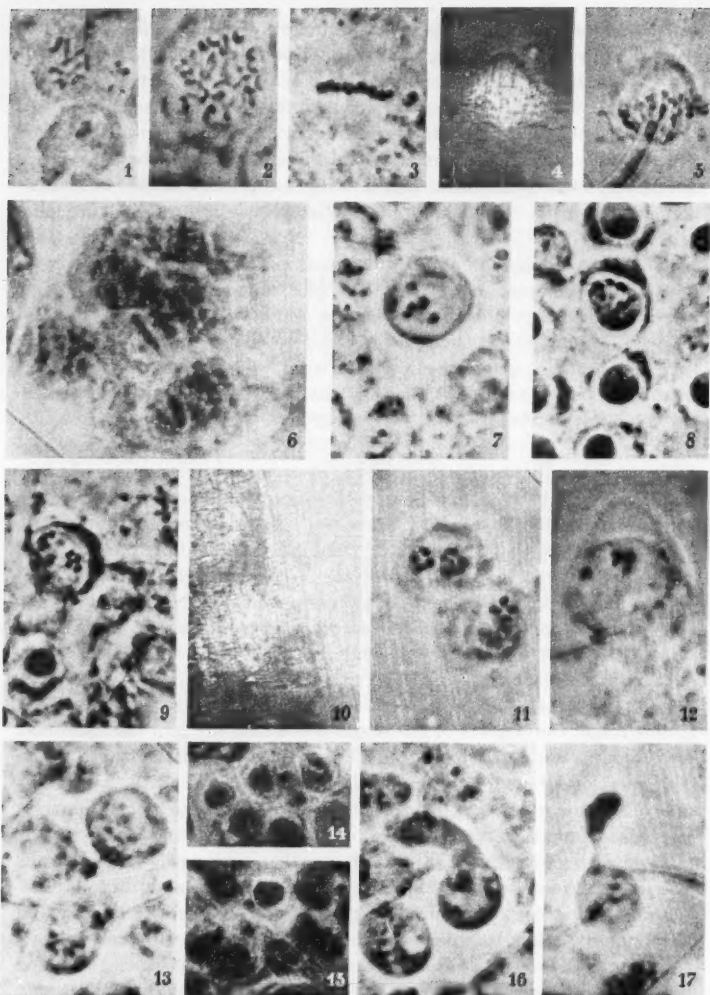
The somatic chromosome set of *Rhabdophaga batatas* was studied only in females, in the mass of somatic tissue attached to the anterior end of the larval ovary. It was established that the chromosome number in the female somatic set  $2S$  is 8 (Fig. 1). In the basal "reservoir" part of the salivary gland chromosomes of female and male larvae, 4 polytene chromosomes can be distinguished (Fig. 6). In the nuclei of the gland proper a great number of tiny chromosome fragments are present. In order to establish the number of chromosomes present in the germ cells  $2S + E$  the chromosomes were counted in spermatogonial metaphases. In most of the 11 investigated metaphase plates, 40 chromosomes were present (Fig. 2); however, in some plates only 38 or 36 chromosomes could be distinguished. Spermatogonial metaphases and anaphases in side

<sup>1</sup> The author is indebted to Dr. E. W. TAYLOR for his advice and assistance with polarized light technique.

view were observed both in stained (with aceto-carmin) and living cells. The spindles were distinctly visible and there was not the slightest doubt about their presence and shape (Fig. 3 and 5). One spermatogonial metaphase was observed in polarized light (Fig. 4). In spite of the fact that the birefringence of the spindle was in some degree obscured by the presence of particles scattering the light, there could be no doubt, in this case, that a true birefringent body was present in this cell, since the light intensity could be largely extinguished by rotating the compensator.

The various stages of the first spermatocyte division were observed under phase contrast and in polarized light. The course of this division can be described as follows: in prophase there is no sign of the synaptic process. The degree of condensation is not uniform for all chromosomes: four of them are extremely condensed and thick, the rest are more or less diffuse and rather clumped, so that the outlines of single chromosomes are not always visible (Fig. 7). The progress of prophase is accompanied by segregation of chromosomes. The four condensed chromosomes are gathered on one side of the nucleus, close to the nuclear membrane, the remaining chromosomes occupy the opposite side and the degree of their condensation prominently increases (Fig. 9). The arrangement of four chromosomes is very typical; they are oriented with their apices toward one point and surrounded by the territory of lighter nucleoplasm, very homogenous in appearance. In this stage in some cells the nucleus is surrounded by prominent light zones resembling a big vacuole (Fig. 8).

In the next observed stage the nucleoplasmic island with four chromosomes was already expelled from the nucleus and lay in its close vicinity (Figs. 11, 12, and 13). The nuclear membrane was also well visible in this stage; the borders of the island containing the four chromosomes were sharp, but no definite membrane could be distinguished. The configuration of the chromosomes remains typical. All four chromosomes are oriented with their apices toward one point, namely, the center of the island. In this stage the chromosomes in the original nucleus are again diffuse and rather scattered. In some cells (Fig. 12) in the cytoplasm, above or below the island with four chromosomes, the big ovoid vacuole was present. This vacuole was observed only in living cells. Its shape, dimensions and position were very characteristic and constant and it was present only in cells in which the island with four chromosomes lay still in the close vicinity of the nucleus. In later stages, when the island had already moved apart, the vacuole was completely absent (Fig. 13). It is difficult, on the basis of the present data, to describe how the expulsion of the nucleoplasmic island, with four chromosomes, from the nucleus takes place. The nuclear membrane seems to be present and intact during the whole division, and neither its



Figs. 1—17. Fig. 1'. Female somatic metaphase. Eighth chromosomes present. Stained with aceto-carmin. Fig. 2. Spermatogonial metaphase. Not all of the 40 chromosomes present visible on the photo. Stained with aceto-carmin. Fig. 3. Spermatogonial metaphase, side view. Stained with aceto-carmin. Fig. 4. Spermatogonial metaphase photographed in polar view. Stained with aceto-carmin. Fig. 4.

<sup>1</sup> All photos were taken by a Leitz camera at  $100 \times 8$  and were printed at the same enlargement. Figs. 1—13 and 16—30—from *Rhabdophaga batatas*. Figs. 14 and 15—from *Wachliella persicariae*. Note the prominent difference in the dimensions of the cells in the two species.

constriction nor bud formation, or rupture, was actually observed. It can only be stated that the presence of the vacuoles is closely connected with this process.

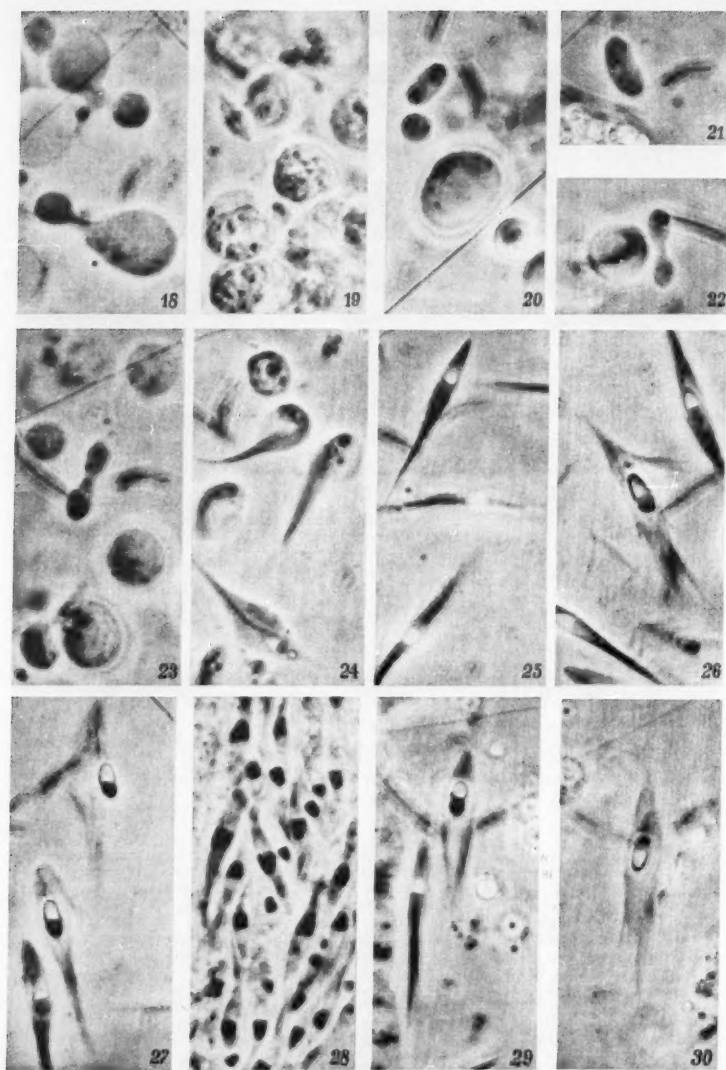
During the whole course of the first spermatocyte division, no trace of spindle, or spindle fibers, could be detected. The spermatocytes in prophase and "anaphase" were observed in polarized light. The birefringent elements were not present. The cells show considerable light intensity but since this could not be extinguished by rotating the compensator it appeared to be caused entirely by light-scattering of the particles in the cells (Fig. 10). The territory surrounding the four chromosomes in polarized light was rather dark and could scarcely be distinguished.

Some additional evidence was obtained from investigations of the late stages of first spermatocyte division in *Wachtliella persicariae* on slides stained with Heidenhain's iron hematoxylin. As was previously established (GEYER-DUSZYŃSKA 1959) the nuclei of germ cells in this species contain 40-odd chromosomes. In the somatic cells of female 8, and in the somatic cells of male 6 chromosomes are present. In the first spermatocyte division not trace of spindle fibers is detected and the presence of the nuclear membrane after the expulsion of the nucleoplasmic island with four chromosomes was established. The arrangement of four chromosomes is also very peculiar here, and similar to the arrangement in *R. batatas* (Figs. 14 and 15). The centriole was not actually observed.

After the expulsion of the four chromosomes, the prominent change in the shape of the cell occurs, and the cytoplasmic protrusion enclosing the island with four chromosomes is formed (Fig. 16). The protrusion elongates greatly, its part proximal to the cell becomes exceedingly thin and the bud, containing four chromosomes, is split off (Figs. 17 and 18).

rizid light. Side view. In 5 per cent dextrose solution. Fig. 5. The same metaphase as in Fig. 4. The picture is inverted in relation to the picture in Fig. 4. (Note the position of the air bubble.) Fig. 6. Nucleus from the basal "reservoir" part of the salivary glands of male larvae, 4 polytene chromosomes visible. Stained with aceto-carmin. Fig. 7. Prophase of the first spermatocyte division. Four condensed chromosomes visible. In 5 per cent dextrose solution. Fig. 8. Late prophase of the first spermatocyte division, the chromosomes already segregated into two distinct groups. The nucleoplasmic island, with four chromosomes lies perpendicularly to the plane of the photo, only three of them visible. In 5 per cent dextrose solution. Fig. 9. Late prophase of the first spermatocyte division. The chromosomes segregated into two distinct groups. The nucleoplasmic island with four chromosomes well visible. In 5 per cent dextrose solution. Fig. 10. The same cell as in Fig. 9, photographed in polarized light. The picture is inverted in relation to the picture in Fig. 9. Note the position of the smaller cell in the corner of the photo. Fig. 11. The first spermatocyte division. The island with the four chromosomes is already expelled from the original nucleus and lies in its vicinity. Stained with aceto-carmin. Figs. 12 and 13. Slightly earlier and approximately the same as in Fig. 11, stages of the first spermatocyte division. In 5 per cent dextrose solution. Figs. 14 and 15. The same as in Fig. 13, stage of the first spermatocyte division in *Wachtliella persicariae*. Fixed in Bouin-Allen and stained with Heidenhain's iron hematoxylin. Fig. 16. First spermatocyte division. The formation of cytoplasmic protrusion enclosing the four expelled chromosomes. In 5 per cent dextrose solution. Fig. 17. The first spermatocyte division, unequal cytokinesis. In 5 per cent dextrose solution





Figs. 18—30. Fig. 18. First spermatocyte division, unequal cytokinesis. In 5 per cent dextrose solution. Fig. 19. Second spermatocyte division, metaphase. In 5 per cent dextrose solution. Figs. 20 and 21. Second spermatocyte division, anaphase. In 5 per cent dextrose solution. Figs. 22 and 23. Second spermatocyte division, telophase. In 5 per cent dextrose solution. Fig. 24. Spermiogenesis: spermatids and residual cells. In 5 per cent dextrose solution. Figs. 25—27. Mature sperms obtained from male. In 5 per cent dextrose solution. Fig. 28. Receptaculum seminis. In 5 per cent dextrose solution. Figs. 29 and 30. Sperms obtained from receptaculum seminis of female. In 5 per cent dextrose solution

The second meiotic division occurs only in the bud and a normal metaphase plate and bipolar spindle are formed (Fig. 19). The four chromosomes divide and the daughter chromosomes pass to the opposite poles (Figs. 20 and 21). In telophase, equal cytokinesis takes place and two small cells are formed (Figs. 22 and 23). The residual cells, containing 36 chromosomes, do not show any sign of further differentiation. The spermatids originate exclusively from small cells containing four chromosomes. During spermiogenesis, they pass through considerable changes in shape and their dimensions increase (Fig. 24). The mature sperms were observed in vesiculae seminalis and spermatoducts of males and receptaculae seminis of females (Fig. 28). The sperm is composed of two parts: an ovoid, central part divided into two regions (apparently the nucleus and the acrosome), and an elongated capsule covered with numerous bristles. The shape and behavior of the sperms, obtained from both sources, in 5 per cent dextrose solution was alike: the capsule bursts and the central part, namely the sperm proper, is released (Figs. 25, 26, 27, 29, 30).

#### Discussion

The course of the first spermatocyte division in *Rhabdophaga batatas* deviates considerably from the typical mitotic pattern. The same seems to be true for *Wachtliella persicariae*. The spindle, the configurations corresponding to metaphase and anaphase of normal mitosis, are absent and the nuclear membrane is present during the whole division. The segregation of chromosomes into two groups occurs, followed by the peculiar expulsion of one of these groups from the nucleus and unequal cytokinesis. The exact moment of this expulsion was not observed. The presence of a big vacuole, surrounding the nucleus in the stage preceding expulsion, and of a smaller vacuole, lying in the close vicinity of the expelled nucleoplasmic island with four chromosomes, indicates that a rapid contraction of the nucleus takes place, the nuclear membrane bursts, and the island is released. Afterwards, the instant healing of the injuries in the membrane surrounding the original nucleus, followed by a prominent increase in its size, occurs, and the vacuole is shifted in the direction of the expelled island. However, other possibilities cannot be excluded, such as disappearance of the nuclear membrane in the vicinity of the island containing four chromosomes, followed by rapid formation of a new membrane in this area, or constriction of the nuclear membrane between the two chromosome groups, followed by bud formation.

So far, only two cases of chromosome migration through the nuclear membrane without visible, permanent injuries in the latter, are known. In *Sciara ocellaris* the elimination of one of the chromosomes from the

resting nuclei of germ cells occurs. According to the description of BERRY (1941), the eliminated chromosome simply crosses the intact nuclear membrane. The second case was reported by HUGHES-SCHRAEDER (1948) and occurs in spermiogenesis of iceryine coccids. Here the two chromosomes migrate from the spermatid nucleus to the sperm tail. This migration is accompanied by the formation of a nuclear diverticulum. The spermatid nucleus remains apparently empty but intact.

The essential features of the first spermatocyte division in *R. batatas* and *W. persicariae*, namely, the complete absence of pairing and the peculiar segregation of chromosomes into two groups followed by separation of these groups, are not limited to these two species, but are common for all representatives of the *Cecidomyiidae* so far investigated. In the present case, the separation is accomplished by expulsion of one group from the intact nucleus, while in the other cases the disappearance of the nuclear membrane and the formation of the spindle were described. There is no agreement about the shape of this spindle: according to KRACZKIEWICZ (1950) it is unipolar; WHITE (1947, 1950) prefers to consider it as bipolar, with one active and one more "diffuse" or passive pole. The possible structure of the spindle in terms of the kind of fibers present was not analyzed. The investigation of the figures offered by both authors reveals that, in *Lasioptera rubi* (KRACZKIEWICZ 1950) and in *Monarthropalpus buxi* (WHITE 1950), the only element of the spindle indicated on the drawings is interzonal fibers connecting both chromosome groups; in *Miastor* (WHITE 1946) and in *Taxomyia taxi* (WHITE 1947), the diagrams do not make it possible to decide what kind of spindle fibers was observed, and in the photos taken from slides stained with gentian violet, the spindles are completely invisible. Both authors state that the spindle appears after the segregation of chromosomes into two groups has been accomplished. In any case, it seems to be obvious that the presence of such a spindle cannot be treated as essential for the chromosome movement in the phase of segregation, and the possible activity of this structure, regardless of the interpretation of its shape and composition offered, must be restricted only to the phase of further separation of the two groups. In this situation it seems that the basis for the description of the first spermatocyte division in other *Cecidomyiidae* species as unipolar or modified bipolar mitosis is far from being sufficient. Moreover, the figures offered by WHITE (1950) for *Monarthropalpus buxi* bear such a close resemblance to the pictures observed in *R. batatas*, that I am inclined to believe that the actual courses of the first spermatocyte division in both species are identical. WHITE's fig. 29, p. 40, indicates that the nuclear membrane is also present during the whole process of segregation of chromosomes in this species, and the release of one chromosome group is accompanied by the partial disappearance of the nuclear

membrane in its vicinity. This conclusion is confirmed by Fig. 30, p. 42, in which the nuclear membrane in the functional daughter cell containing the expelled chromosome is absent, while in the residual cell it is still present. WHITE describes the line surrounding both chromosome groups in his figures as the border of a barrel-shaped spindle. In my opinion, this line represents nothing else but the nuclear membrane.

In this situation, it seems highly probable that in all *Cecidomyiidae* species the pattern of the first spermatocyte division is uniform, and if some interspecific differences exist, they are of secondary importance. This division bears so little resemblance to the typical mitosis that it seems more plausible to omit this term and to describe it merely as "segregating division", and the peculiar arrangement of chromosomes merely as "monocentric configuration".

Now, the question arises how to explain the occurrence of this "monocentric configuration", and such kinetic relations as we observe in this division.

It must be remembered that cases are known in which the peculiar orderly arrangements of chromosomes are organized merely as a result of specific positive or negative affinities of chromosome parts to the centriole. A good example of configurations which arise as a result of attraction between the centrioles and centromeres of chromosomes can be found in the experiments of BLOOM, ZIRKLE and URETZ (1955; comp. also ZIRKLE 1957). In untreated cells of *Triturus viridescens* in tissue culture, they often observed in metaphase the occurrence of more or less numerous single chromosomes lying in close vicinity of the centriole with their centromeres adjacent to it. Each chromosome can become centrophilic and this happens when the centromere of metaphasic chromosomes pass sufficiently near the centriole. The centrophilic chromosome joins the metaphase plate and divides normally after several minutes. After irradiation of mitotic cells with an ultraviolet microbeam the spindle fails to appear, or, if already present, it disappears and the chromosomes take up a random arrangement. Later they form "quasi-rosettes", namely, they assume a configuration in which the centromeres of all chromosomes point to the common center. The division of chromosomes is completely suppressed and the quasi-rosette separates frequently into two quasi-rosettes composed of undivided chromosomes segregated at random. The daughter quasi-rosettes move apart and their separation is followed by cytokinesis. BLOOM, ZIRKLE and URETZ suggest that in the central point of the quasi-rosettes two close-lying centrioles are present. As these centrioles move apart, the chromosomes follow their movement and separate at random into two quasi-rosettes. Analogous quasi-rosettes were observed by the author in embryos of

*R. batatas* after irradiation of early cleavage nuclei with the ultraviolet microbeam (unpublished).

Configurations arising as a consequence of different affinities, namely, the repulsions occurring between the chromosome ends and the centriole, are also known. In leptotene, in insect spermatocytes, the ends of all chromosomes often come together at one spot opposite the centriole and form so-called "bouquet". When the daughter centrioles move apart, the chromosome ends, or in the case of small chromosomes, entire chromosomes follow along inside the nuclear membrane. Chromosome ends behave as if the centers of active movement were present there (comp. RIS 1955).

Returning now to the first spermatocyte division in *Cecidomyiidae*, a tentative assumption is that the different affinities between the centriole and the single chromosomes are responsible for the segregation of these chromosomes into two groups and the occurrence of monocentric configuration. If, in prophase of the first meiotic division in the case of *R. batatas* and *W. persicariae* in the four chromosomes, a force of attraction operates between the centromeres and the centriole, and in the remaining 30-odd chromosomes a force of repulsion occurs between their ends and the centriole, the chromosome will segregate in the manner just observed: four chromosomes will gather on one side of the nucleus adjacent to the centriole, and the remaining chromosomes will occupy the opposite side. That a centriole is present in the first spermatocyte seems certain, but as it was not actually observed little can be said about its position and behavior. Also, little is known about the nature of the differences in behavior of the two chromosome groups except the common agreement that their source is to be looked for in a different, namely paternal and maternal origin of the two groups.

In order to check if the explanation offered for *Cecidomyiidae* is valid also for other cases, we will consider briefly the so-called "unipolar mitosis". Under the term "unipolar spindle" at least three intrinsically different configurations were described. The half-spindles occurring in an abortive first meiotic division in some insects in haploid males, described as unipolar [i.e., case of *Aenoplex smithii* (KOONZ 1936)] pose no special problem in connection with present considerations as they are not connected with chromosome movement, and this last does not show odd traits. Perhaps the best term for such structures is just abortive half-spindles. The second, very distinct group, consists of spindles described by SCHRADER (1923, 1929) and HUGHES-SCHRADER (1935, 1948) for several species of lecanoid coccids. All these spindles occur in the second meiotic division of males and their presence is connected with the reduction of chromosome number. In lecanoid coccid males, two haploid chromosome sets show differential heteropycnosis and coiling

cycles. In the second spermatocyte division only the heteropycnotic set assumes plate-like orientation and typical chromosomal fibers develop only from these chromosomes and converge in a centriole, forming a half-monopolar spindle. Between the two chromosome sets interzonal connections appear, and in one species, in addition, the non-heteropycnotic chromosome set forms some few, non-functional fibers. According to HUGHES-SCHRADER (1948), these configurations stemmed from the basic pattern of highly specific coccid mitosis and, on the basis of kinetic relations, she prefers to call them "monocentric bipolar spindles", which term seems to be much better than unipolar spindle.

The last, third, group of unipolar spindles consists of the case of the genus *Sciara* (METZ 1926, 1933, 1938; METZ *et. al.* 1926) and of *Micromalthus debilis* haploid male (SCOTT 1936). This group bears striking similarities to the situation reported for *Cecidomyiidae*. It seems that for these three cases a common denominator can be found. Both in *Sciara* and in *Micromalthus* unipolar spindles occur in the first meiotic division in the male. Prophase is here incomplete and probably only the leptotene stage is present. The chromosomes appear as univalents and there is no sign of synaptic processes. After the nuclear membrane vanishes, no equatorial metaphase plate is formed, but nevertheless, a very regular and characteristic arrangement of chromosomes occurs: all chromosomes are arranged with their centromere regions pointing towards a single point on the cell wall, with their arms radiating into the cytoplasm. The chromosomes start their anaphase movement directly from this position and in connection with this movement the half-spindle fibers appear. In *Micromalthus debilis* the half-spindle is composed of ten relatively heavy straight fibers connecting all ten chromosomes present with the region of the centriole, which, starting from this stage, is very well visible. The fibers become longer as the anaphase proceeds. The paths of the chromosomes are divergent. Chromosomes move away from the centriole with their centromeres hindmost and their free ends foremost, as if in these ends the centers of active movement were present. The movement ceases when all the chromosomes reach the area of the cell opposite the centriole. This division is completely abortive, for neither the chromosomes nor the cell divides. SCOTT states that, although the ten fibers extend between the chromosomes and the centriole as chromosomal fibers usually do, on the basis of functional relations they must be considered merely as interzonal connections. Their presence does not explain the chromosome behavior and the chromosome movement must be described as highly autonomous.

In *Sciara*, the behavior of chromosomes during the anaphase of the first meiotic division is not uniform; four paternal chromosomes move backwards in relation to the central point, the remaining chromosomes

either remain stationary or move slightly in its direction. The orientation of the chromosomes which move away from the centriole is similar to that in *M. debilis*: the centromere regions are directed hindermost, the free ends foremost. The paths of retreating chromosomes are divergent and according to the description of METZ, each retreating chromosome may follow any radial line within the theoretical cone delineated by the imaginary extension of the half-spindle. As a result of this division the four backward moving paternal chromosomes are eliminated in a small cytoplasmic bud from the main cell, and degenerate. The presence of the half-spindle, according to METZ, is indicated by the arrangement of chromosomes. Actually, he was able to detect only four long, very distinct fibers connecting the retreating chromosomes with the central point, and in favorable cases, short fibers extending from the remaining chromosomes towards this point. All these fibers lacked sharp focalization; the presence of the centriole was not demonstrated. According to my opinion the localization of chondriosomes, which are relatively massive and numerous and often occupy the intermediate area between the retreating chromosomes and the remaining ones, testifies against the presence of spindle fibers in this half-spindle other than those actually observed. The fact that the retreating chromosomes are able to pass through a mass of scattered chondriosomes is stressed also by METZ, but in connection with his hypothesis of autonomous chromosome movement in this peculiar spindle. METZ' tries to explain the autonomous chromosome movement in terms of changes in viscosity of the cytoplasm adjacent to the chromosomes.

It seems that the explanation offered for the monocentric configurations occurring in the first spermatocyte division in *Cecidomyiidae*, namely, the description of chromosome movement in terms of two different kinds of forces operating between the chromosomes and the centriole, is applicable to both cases. It seems highly probable that both in *Sciara* and in *Micromalthus* an attraction between the centromeres and the centriole leads, in the first phase, to the occurrence of orderly arrangement of the chromosomes adjacent to the centriole; in the case of *M. debilis* the centriole is distinctly visible. Next, the second force begins to act, namely, a force of repulsion between chromosome ends and the centriole, and when the repulsion exceeds the attraction, the backward movement of the chromosomes starts. Such a sequence of events is here indicated not only by the direction of the chromosome movement but also by actually observed shapes. In *Sciara* the force of repulsion between chromosome ends and the centriole appears or increases to a sufficient level only in the paternal chromosome set; only these chromosomes move backwards, and the segregation of chromo-



somes into two groups occurs. In *M. debilis* the force of repulsion increases sufficiently in all of the chromosomes in the second phase of division and all the chromosomes move backwards. In this case the situation is the simplest and only one assumption is necessary, namely, that the moment of appearance, or prominent increase of the repulsion force is shifted from leptotene to the later phase of division.

In spite of prominent and obviously basic differences in the course of the first spermatocyte division in *Cecidomyiidae*, *Sciara* and *Micromalthus*, the general pattern of chromosome movement seems to be uniform in these three cases and, as was shown, can be explained according to one common model. The two terms proposed for *Cecidomyiidae*, namely, the "monocentric configuration" for designation of the peculiar chromosome arrangement, and "segregating division" for description of the division course, are here also applicable, with one restriction: that in *Micromalthus* the division is abortive. These terms seem to be more accurate than the terms "unipolar" spindle and "monocentric" or "unipolar" mitosis.

### Summary

The first spermatocyte division has been investigated in *Rhabdophaga batatas* WALSH and *Wachtliella persicariae* L. It was shown that the course of this division cannot be described as mitosis, either "unipolar" or "modified bipolar". Its essential features are: complete absence of pairing and the segregation of the chromosomes into two groups composed of 4 and 30-odd chromosomes. The segregation is accomplished by a peculiar expulsion of the group of 4 chromosomes from the main nucleus followed by an unequal cytokinesis. The spindle is absent and the nuclear membrane remains present during the entire course of the division. The second spermatocyte division occurs only in the smaller cell, which contains 4 chromosomes and bears all features of normal mitosis.

For the description of the course of the first spermatocyte division and chromosome distribution, which occurs in this division, the terms "segregating division" and "monocentric configuration" were proposed.

The available descriptions of the first spermatocyte division in other species of *Cecidomyiidae* have been analyzed. The pattern of this division in all so far investigated cecidomyiid species is very uniform and the terms "unipolar" or "modified bipolar" mitoses are here also inadequate.

The cases were discussed in which the peculiar chromosome arrangements arise merely as a result of positive or negative interrelations between the centriole and the chromosome parts. With this as background, the monocentric configurations in *Cecidomyiidae* were explained in terms

of an attraction between the centriole and centromeres, operating in one group, and a repulsion between the centriole and the chromosome ends acting in the second.

The other so-called unipolar mitoses have been analyzed. It was shown that under this term at least three intrinsically different configurations have been described. For the cases of *Sciara*, *Micromalthus debilis* and *Cecidomyiidae*, the common denominator can be found: the chromosome movements in *Sciara* and *M. debilis* can also be explained as set forth above for *Cecidomyiidae*, i.e. in terms of two kinds of forces operating between the centriole and the chromosomes. The several spindle fibers present in *Sciara* and *Micromalthus* do not seem to be crucial for the chromosome movements.

### References

- BERRY, R. O.: Chromosome behavior in the germ cells and development of the gonads in *Sciara ocellaris*. J. Morph. **68**, 547—585 (1941).
- BLOOM, W., R. E. ZIRKLE and R. B. URETZ: Irradiation of parts of individual cells. III. Effects of chromosomal and extrachromosomal irradiation on chromosome movements. Ann. N.Y. Acad. Sci. **59**, 503—513 (1955).
- FELT, E. P.: Studies in *Cecidomyiidae*. I. Bull. N.Y. St. Mus. **104**, 116—132 (1906). — Studies in *Cecidomyiidae*. II. Bull. N.Y. St. Mus. **124**, 307—510 (1908). — A study of gall midges. II. *Itididae*. Bull. N.Y. St. Mus. **175**, 79—246 (1915). — Key to American insect galls. Bull. N.Y. St. Mus. **200**, 5—310 (1917).
- GEYER-DUSZYŃSKA, I.: Experimental research on chromosome elimination in *Cecidomyiidae* (Diptera). J. exp. Zool. **141**, 391—448 (1959).
- HUGHES-SCHRADER, S.: The chromosome cycle of *Phenacoccus* (Coccidae). Biol. Bull. **69**, 462—468 (1935). — A new type of spermiogenesis in iceryne coccids, with linear alignment of chromosomes in the sperm. J. Morph. **78**, 43—84 (1946). — Cytology of coccids (*Coccoidea-Homoptera*). Advanc. Genet. **2**, 127—203 (1948).
- KOONZ, C. H.: Some unusual cytological phenomena in the spermatogenesis of a haploid parthenogenetic hymenopteran, *Aenoplex smithii* (PACKARD). Biol. Bull. **71**, 375—385 (1936).
- KRACZKIEWICZ, Z.: La spermatogénèse chez *Miastor metraloas*. C.R. Soc. Biol. (Paris) **127**, 1143—1146 (1938). — Recherches cytologiques sur les chromosomes de *Lasiptera rubi*. Zool. Polon. **5**, 73—117 (1950).
- METZ, C. W.: An apparent case of monocentric mitosis in *Sciara* (Diptera). Science **63**, 190—191 (1926). — Monocentric mitosis with segregation of chromosomes in *Sciara* and its bearing on the mechanism of mitosis I. The normal monocentric mitosis. II. Experimental modification of the monocentric mitosis. Biol. Bull. **64**, 333—347 (1933). — Chromosome behavior, inheritance and sex determination in *Sciara*. Amer. Naturalist **72**, 485—520 (1938).
- M. S. MOSES and E. N. HOPPE: Chromosome behavior and genetic behavior in *Sciara* (Diptera) I. Chromosome behavior in the spermatocyte divisions. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **42**, 237—270 (1926).
- RIS, H.: Cell division. In: Analysis of development, edit. B. H. WILLIER *et al.*. p. 91—125. Philadelphia: W. B. Saunders Company 1955.

- SCHRADER, F.: A study of the chromosomes in three species of *Pseudococcus*. Arch. Zellforsch. 17, 45—62 (1923). — Experimental and cytological investigations of the life cycle of *Gossyparia spuria* (Coccidae) and their bearing on the problem of haploidy in males. Z. Zool. 134, 149—179 (1929).
- SCOTT, A. C.: Haploidy and aberrant spermatogenesis in a coleopteran, *Micromalthus debilis* LE CONTE. J. Morph. 59, 485—515 (1936).
- TAYLOR, E. W.: Dynamics of spindle formation and its inhibition by chemicals. J. biophys. biochem. Cytol. 6, 193—196 (1959).
- WHITE, M. J. D.: The cytology of the *Cecidomyiidae* (Diptera). II. The chromosome cycle and anomalous spermatogenesis of *Miastor*. J. Morph. 79, 323—370 (1946). — III. The spermatogenesis of *Taxomyia taxi*. J. Morph. 80, 1—24 (1947). — Cytological studies on gall midges. Univ. Texas Publ. No 5007, 1—80 (1950). — Animal cytology and evolution, 2nd edit. Cambridge: Cambridge University Press 1954.
- ZIRKLE, R. E.: Partial cell irradiation. Advanc. biol. med. Phys. 5, 103—146 (1957).

Dr. IRENE GEYER-DUSZYŃSKA,  
Department of Zoology, Columbia University,  
New York 27, N.Y., U.S.A.

From the Zoological Institute, Hokkaido University, Sapporo, Japan  
**OBSERVATIONS ON THE MODIFICATION IN SIZE AND SHAPE  
OF CHROMOSOMES DUE TO TECHNICAL PROCEDURE\***

By

MOTOMICHI SASAKI\*\*

With 9 Figures in the Text

(Received July 28, 1960)

The remarkable development of cytological techniques for reliable numerical and morphological analyses of mammalian chromosomes particularly human chromosomes, has produced by several investigators numerous papers with new and unexpected findings (CHU and GILES 1959; FORD and HAMERTON 1956; FORD, HAMERTON and JACOBS 1958; FORD, JONES, MILLER, MITWOCH, PENROSE, RIDLER and SHAPIRO 1959; FORD, JONES, POLANI, DE ALMEDIA and BRIGGS 1959; FORD, POLANI, BRIGGS and BISHOP 1959; HSU and POMERAT 1953; HUNGERFORD, DONNELLY, NOWELL and BECK 1959; LEJEUNE, TURPIN and GAUTIER 1959; LEVAN and HSU 1959; MAKINO and SASAKI 1959, 1960 a, b; SASAKI and MAKINO 1960; TJIO and LEVAN 1956; TJIO and PUCK 1958; TJIO, PUCK and ROBINSON 1959). However, certain contradictions on morphological details of chromosomes, mostly due to technical variations, are still unavoidable. For example, at present different investigators are not in complete agreement as to the correct identification of the X chromosome of man.

In the course of a study of normal somatic chromosomes of man, the author's attention was attracted to the fact that there are considerable variations in length and arm-ratio of individual chromosomes, which might be due to technical procedures, or varying degrees of chromatid condensation. With the hope of elucidating the course of chromosome length variations, the following experiments were undertaken.

#### Materials and Methods

Tissues used for this investigation were taken from two to seven months old human embryos and new born rats. Splenic tissue of a golden hamster, age one month, was also employed. The tissues were cut into pieces 1—2 mm in size,

\* Contribution No. 471 from the Zoological Institute, Faculty of Science, Hokkaido University, Sapporo, Japan. Aided partly by a grant from the Rockefeller Foundation for research in cytology and partly by a grant from the Damon Runyon Memorial Fund for Cancer Research to S. MAKINO (DRG-563).

\*\* The author wishes to express his cordial thanks to Professor SAJIRO MAKINO for his kind direction and improvement of the manuscript. Further appreciations should be extended to Drs. C.M. POMERAT and J. BLUMEL, University of Texas, who revised the data of this paper.

planted directly into TD-15 or TD-40 culture flasks and incubated at 37° C. McCoy's *et al.* (1956) synthetic medium was used with some modifications as the nutrient: it consisted of 14 different amino acids, eight kinds of vitamins in Earle's balanced salt solution and was supplemented with 20 per cent inactivated horse serum. After several days of incubation, the cells growing on the glass wall of the culture flasks were treated with a  $50 \times 10^{-6}$  M colchicine solution for a period varying from one to five hours at 37° C. Some cultures received no colchicine treatment. After treatment with a 0.2 per cent trypsin solution for ten minutes at 37° C the cultures were removed from the glass surface. They were then centrifuged for about five minutes at 1000 rpm. To the cell deposits dropped on glass slides were added an approximately equal volume of distilled water. After a five to ten minute interval the material was squashed with the application of acetic dahlia solution and an even pressure of the thumb. The measurements of the chromosomes were made on the basis of camera lucida drawings at a magnification of about 3000 times.

## Results

### 1. Variations in length of chromosomes

Individual chromosomes in the metaphase stage usually exhibited a considerable variation in length due to varying degrees of condensation of composing chromatids. With the hope of clearly demonstrating this

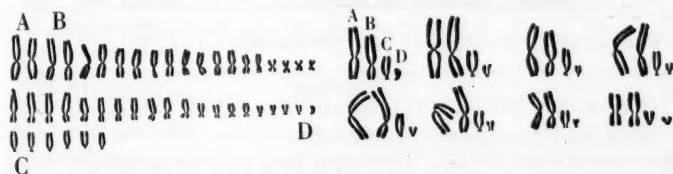


Fig. 1. Left, Idiogram of a normal human somatic cell. Right, Four marker chromosomes (A, B, C, and D), from eight different metaphasic cells showing different degrees of chromatid condensation

variation, the author undertook some chromosome measurements. The idiogram shown in Fig. 1 represents a human somatic complement from a splenic tissue culture cell of a male embryo. The chromosomes are arranged into three morphological groups on the basis of their size and position of their centromeres. The top row includes 20 M chromosomes with median centromeres, the middle row contains 20 S chromosomes with subterminal centromeres, and the bottom row shows six T chromosomes with nearly terminal centromeres. Within each group the presumably homologous chromosomes were arranged in descending order of size. Four well distinguishable chromosomes were designated as A, B, C and D, Fig. 1. A corresponds to the largest M chromosome characterized by a nearly median centromere, B to the second largest chromosome with a submedian centromere, C to the largest T chromosome and D to the smallest S element. In order to determine the effect of colchicine on chromosome length, the slides were

treated with colchicine for various periods ranging from one to five hours at a dose level of  $50 \times 10^{-6}$  M. In the slides prepared in this manner 18 metaphase plates were examined and four elements corresponding to *A*, *B*, *C* and *D* were carefully drawn. Of these eight examples are shown in Fig. 1. Length variations, based on measurements of drawings, for chromosomes *A*, *C* and *D* are illustrated in Fig. 2.

Inspection of Fig. 2 shows that there is a considerable length variation of these chromosomes in different plates. The *A* chromosome is quite remarkable in showing a length variation from  $4-8 \mu$  which is probably due to varying degrees of condensation. The length variation

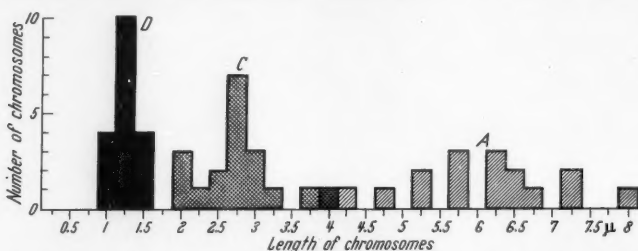


Fig. 2. Distribution of chromosome length in *A*, *C* and *D* chromosomes, from human somatic complements

range of the *C* chromosome fluctuates from  $2-4 \mu$ , while the *D* chromosome varies from  $1-1.5 \mu$ . These data seem to indicate that the variation in length is much greater in the longer chromosomes than in the shorter ones.

Next, the ratios of length were compared between the largest (*A*) and the smallest (*D*) elements derived from different metaphase plates based on two groups of slides. One group of slides received the colchicine treatment for two hours, and the other group for five hours. In the former group, 10 metaphase plates showing rather well elongated chromosomes were chosen, while in the latter group the same number of plates were selected showing highly contracted chromosomes. The ratio of length of the *A* chromosome to that of the *D* chromosome was

Table 1. Variation in ratio of length between the longest and the shortest human chromosomes following colchicine treatment

Treatment time	Ratios of longest/shortest chromosome										Mean *
2 hours	7.0	6.0	5.8	5.7	5.6	5.6	5.6	5.5	5.4	5.0	$5.72 \pm 0.16$
5 hours	4.5	4.4	4.3	3.8	3.6	3.5	3.5	3.4	3.4	3.2	$3.76 \pm 0.15$

\*  $T=8.94$ ,  $P<0.001$ .

calculated on the basis of the above data. The results are shown in Table 1. In the two hour-treated group, the mean value of the ratio under consideration was 5.72, whereas in the five hour-treated group it was 3.76. Furthermore, appropriate statistical tests proved that a significant difference was present between the two values obtained from

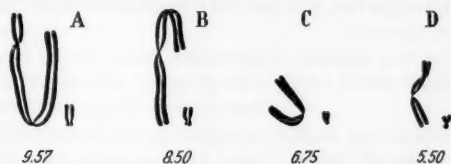


Fig. 3. Longest and shortest chromosomes in four different cells of the golden hamster. *A* and *B*, untreated controls, *C* and *D*, treated with colchicine for 3 hours at a dose level of  $50 \times 10^{-6}$  M. The numbers at the bottom indicate the ratio of the longest/shortest, in each

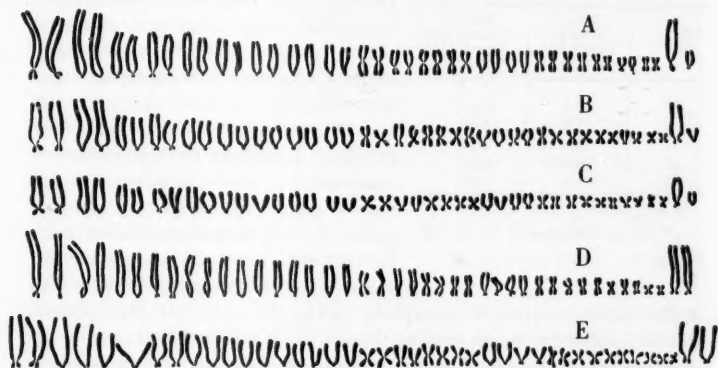


Fig. 4. Idiogram analyses of rat somatic complements, three male cells (*A*, *B*, and *C*) and two female cells (*D* and *E*), showing different degrees of chromatid condensation under different colchicine treatments

the two groups ( $P < 0.001$ ). From the above results, the following statement may be made. The process of chromatid condensation is not always uniform or synchronous in all members of a complement at a given stage of the mitotic cycle. Within a given metaphase plate, longer elements tend to be more contracted by the colchicine treatment than shorter ones.

To supplement the above data, similar analyses were carried out on somatic cells, grown in tissue culture, of rats and golden hamsters. In Fig. 3 are presented the largest and the smallest chromosomes drawn from four different metaphase cells of the golden hamster. Two sets of chromosomes shown in *A* and *B* of Fig. 3 were drawn from two early



metaphase plates which received no colchicine treatment, while *C* and *D* were taken from two metaphase plates receiving colchicine treatment for three hours. Ratios in length of the large element to that of the small element were calculated as 9.57, 8.50, 6.75 and 5.50 for *A*, *B*, *C* and *D*, respectively. Thus, in the golden hamster the difference in degree of chromosome condensation was also very remarkable between the larger and the smaller element.

Fig. 4 shows five somatic chromosome complements of rats drawn from five different slides which were prepared with different colchicine

Table 2. Variation in total length of the haploid autosomal complement and in ratio of length between the longest and the shortest chromosomes of rats

Chrom. set *	Total haploid autosomal length	Ratio of longest and shortest elements
<i>A</i>	74.5	4.92
<i>B</i>	57.6	4.00
<i>C</i>	47.4	2.99
<i>D</i>	74.6	6.38
<i>E</i>	58.6	4.09
Mean	$62.5 \pm 5.43$	$4.47 \pm 0.51$

\* *A*—*E* correspond to *A*—*E* of Fig. 4.

treatment. The chromosomes were arranged in descending order of size into 20 supposedly homologous pairs of autosomes. The sex elements were placed outside the somatic series. In Table 2, total lengths of the haploid autosomal complement and ratios of length between the longest and the shortest elements are presented. The measurements are based on 3 male cells and 2 female cells from different preparations. According to the degree of condensation, the total haploid lengths varied from 74.6 to 47.4  $\mu$ , and the ratios of longest/shortest varied from 6.38—2.99 (Table 2). A parallelism seems to exist between the two values:

in the more contracted metaphase plate the value of the longest/shortest measured much smaller than in the less contracted one.

In addition, ratios of length between the longest and the shortest elements were compared between the two groups of slides, one from colchicine-treated cultures and the other from non-treated cultures. In each group, 10 metaphase plates were selected and the measurements were made on the basis of chromosome drawings. The mean values of longest/shortest were 6.43 for the non-treated group and 3.96 for the colchicine-treated group (Table 3). Statistical tests revealed a significant difference between the values from the two groups of slides ( $P < 0.001$ ).

Table 3. Variation in ratio of length between the longest and the shortest rat chromosomes following colchicine treatment

Treatment time	Ratios of longest/shortest chromosome										Mean *
Untreated (Control)	7.4	7.0	6.6	6.5	6.4	6.3	6.3	6.2	6.0	5.6	$6.43 \pm 0.50$
3 hours	4.8	4.6	4.6	4.5	4.1	4.0	3.6	3.2	3.1	3.1	$3.96 \pm 0.20$

\*  $T = 9.50$ ,  $P < 0.001$ .

In order to supplement the above facts, a detailed comparison of chromosome length was made between two types of metaphase plates; one showing highly contracted chromosomes (Fig. 4, *C*), and the other well-elongated ones (Fig. 4, *D*). The relative lengths of individual chromosomes was expressed in terms of their percentage of the haploid autosomal complement. The results obtained are shown in Fig. 5. In members from the 1st to the 11th pairs, the relative length was found to be shorter in plate *C* than in plate *D*, whereas in members from the 12th to the 20th pairs the value was much larger in plate *C* than in plate *D*. From the data it is evident that the degree of condensation of chromosomes at different stages of a mitotic cycle is not absolutely uniform in all members: in longer elements the degree of condensation or elongation is generally greater than in the shorter ones.

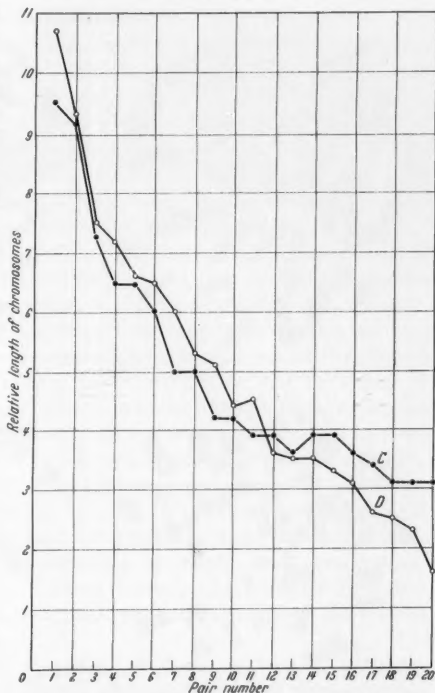


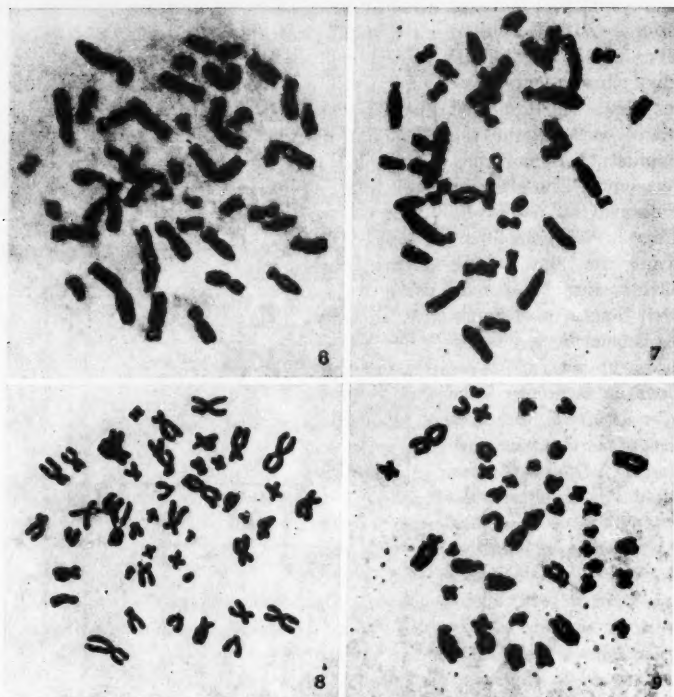
Fig. 5. Comparison of relative lengths of haploid autosomal complements between two cells of rats, showing different degrees of chromatid condensation. Values expressed in terms of percentages of the total haploid autosomal complement. *C* and *D* are based on ideograms of *C* and *D* in Fig. 4.

## 2. Variation in arm ratio

The chromosomes forming the 2nd largest pair of the human somatic complement were clearly identified because of their particular size and submedian centromeres.

Eight examples of these are referred to as *B* in Fig. 1. It is clearly evident from the figure that there is a considerable variation in arm ratio of the *B* element. Table 4 shows the data regarding the variation in the *B* element according to different colchicine treatment. The mean value of the arm ratio was found to be 1.83 for the two hour treatment

and 1.45 for the five hour treatment. However, a wide range of variation can be seen in both cases. Examination of the data revealed a significant tendency for the centromere generally to be located in the more median



Figs. 6—9. Photomicrographs of somatic cells in rats and man, under different colchicine treatment. 6 and 8, human complexes. 7 and 9, rat complexes. 6,  $\times 1400$ . 7—9,  $\times 1600$ . Colchicine-treatment is 1, 1, 4 and 5 hours for Figs. 6—9, respectively

Table 4. Variation in arm ratios of *B* chromosome of human somatic cells following colchicine treatment

Treatment time	Arm ratios in <i>B</i> chromosome										Mean *
2 hours	2.43	2.00	2.00	1.88	1.75	1.75	1.75	1.71	1.60	1.50	$1.83 \pm 0.08$
5 hours	1.75	1.66	1.66	1.63	1.40	1.40	1.33	1.33	1.25	1.15	$1.45 \pm 0.06$

\*  $T=1.049$ ,  $P<0.3$ .

position in the more highly contracted chromosome than in the less contracted chromosome so far as the same type of chromosome from different cells was concerned. Although the value obtained was not

remarkable, an appropriate statistical test revealed that the difference in arm ratio of the *B* chromosome between the two experimental groups is significant at the 70 per cent level of fiducial probability.

### Discussion

The possibility of the erroneous counting of mammalian chromosomes is primarily attributable to the difficulty of obtaining reliable material for chromosome study (BEATTY 1954). Along with the development of convenient and excellent techniques with the use mostly of tissue culture materials, the error in counting has been reduced in recent years, and the morphological characterization of individual chromosomes has been carried out in considerable detail. Even under these conditions technical accidents still make identification of chromosomes difficult.

Some authors (FORD, HAMERTON and JACOBS 1958; LEVAN and HSU 1959; MAKINO and SASAKI 1960) have stated that the human somatic complement contains certain elements which are very difficult to identify. This is due to the usual transformation in size and shape of these elements resulting from elongation or condensation of chromatids due to technical accidents. Results of the present experiments show that the degree of chromatin condensation varies according to the duration of the colchicine treatment, and that in a given cell longer chromosomes tend to be more contracted than shorter ones by this procedure. TJIO and PUCK (1958), and CHU and GILES (1959) have expressed the lengths of individual chromosomes as relative lengths in terms of percentage of the haploid autosomal complement. This might be applicable if the degree of condensation were uniform in all the members. Generally, most cases are unfavorable for this possibility. Indeed, there is a considerable difference in the values of the relative length and the arm ratio among the reports of different authors.

In the present status of investigation, therefore, the identification of individual chromosomes in the somatic complement and their matching into homologous pairs must be of approximation in most cases. Further improvement of techniques is desirable for reliable chromosome study. ROTHFELS and SIMINOVITCH (1958) described an air-drying method for flattening and spreading chromosomes at metaphase. This technique produces a more uniform and complete flattening of cells than can be achieved by the usual squash methods, the morphological alteration of individual chromosomes being avoided to a certain extent.

### Summary

The modification in size and shape of chromosomes due to different technical procedures has been investigated on mammalian somatic chromosomes grown in tissue culture. Results show that (1) highly contracted chromosomes tend to have their centromeres more median than less contracted ones in different cells and (2) longer chromosomes

tend to contract more strongly than shorter ones in the same cell by colchicine treatment. It was suggested that the process of chromatid condensation may not always be uniform in all chromosomes at a given stage of the mitotic cycle.

### References

- BEATTY, R. A.: How many chromosomes in mammalian somatic cells? *Int. Rev. Cytol.* **3**, 177—197 (1954).
- CHU, E. H. Y., and H. GILES: Human chromosome complements in normal somatic cells in culture. *Amer. J. hum. Genet.* **11**, 63—79 (1959).
- FORD, C. E., and J. L. HAMERTON: The chromosomes of man. *Nature (Lond.)* **178**, 1020—1023 (1956).
- J. L. HAMERTON and P. A. JACOBS: Human somatic chromosomes. *Nature (Lond.)* **181**, 1565—1568 (1958).
- K. W. JONES, O. J. MILLER, U. MITWOCH, L. S. PENROSE, M. RIDLER and A. SHAPIRO: The chromosomes in a patient showing both mongolism and the Klinefelter syndrome. *Lancet* **1959I**, 709—710.
- P. E. POLANI, J. C. DE ALMEDIA and J. H. BRIGGS: A sex-chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner's syndrome). *Lancet* **1959I**, 711—713.
- P. E. POLANI, J. H. BRIGGS and P. M. F. BISHOP: A presumptive human XXY/XX mosaic. *Nature (Lond.)* **183**, 1030—1032 (1959).
- Hsu, T. C., and C. M. POMERAT: Mammalian chromosomes *in vitro*, II. A method for spreading the chromosomes of cells in tissue culture. *J. Hered.* **44**, 23—29 (1953).
- HUNGERFORD, D. A., A. J. DONNELLY, P. C. NOWELL and S. BECK: The chromosome constitution of a human phenotypic intersex. *Amer. J. human. Genet.* **11**, 215—236 (1959).
- LEJEUNE, J., R. TURPIN et M. M. GAUTIER: Le mongolism premier exemple d'aberration autosomique humaine. *Ann. Génét.* **1**, 41—49 (1959).
- LEVAN, A., and T. C. HSU: The human idiogram. *Hereditas (Lund)* **45**, 665—674 (1959).
- MAKINO, S., and M. SASAKI: On the chromosome number of man (A preliminary note). *Proc. Jap. Acad.* **35**, 99—104 (1959). — Chromosome constitution in normal human subjects and in one case of true hermaphroditism. (A preliminary note). *Proc. Jap. Acad.* **36**, 156—161 (1960). — A chromosome survey in a Japanese population. *Amer. J. hum. Genet.* (in press).
- MCCOY, T. A., M. MAXWELL and R. E. NEUMAN: The amino acid requirements of the Walker carcinoma 256 *in vitro*. *Cancer Res.* **16**, 979—984 (1956).
- ROTHFELS, K. H., and L. SIMINOVITCH: An air-drying technique for flattening chromosomes in mammalian cells *in vitro*. *Stain Technol.* **33**, 73—77 (1958).
- SASAKI, M., and S. MAKINO: The chromosomal constitution of a human hermaphrodite. *Tex. Rep. Biol. Med.* **18**, 493—500 (1960).
- TJIO, J. H., and A. LEVAN: The chromosome number of man. *Hereditas (Lund)* **42**, 1—6 (1956).
- , and T. T. PUCK: The somatic chromosomes of man. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **44**, 1229—1237 (1958).
- — and A. ROBINSON: The somatic chromosomal constitution of some human subjects with genetic defects. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **45**, 1008—1016 (1959).

Dr. MOTOMICHI SASAKI  
Zoological Institute, Hokkaido University,  
Sapporo, Japan

Aus der Botanischen Abteilung des Naturhistorischen Museums in Wien

AKZESSORISCHE CHROMOSOMEN BEI *ACHILLEA*:  
STRUKTUR, CYTOLOGISCHES VERHALTEN,  
ZAHLENMÄSSIGE INSTABILITÄT UND ENTSTEHUNG  
(ZUR PHYLOGENIE DER GATTUNG *ACHILLEA*, V.)

Von

FRIEDRICH EHRENDORFER

Mit 5 Textabbildungen

(Eingegangen am 19. September 1960)

Inhaltsübersicht	Seite
A. Einleitung . . . . .	523
B. Material und Methodik . . . . .	524
C. Akzessorische Chromosomen bei verschiedenen diploiden (und polyploiden) Wildsippen . . . . .	525
D. Akzessorische Chromosomen bei <i>Achillea asplenifolia</i> und ihren Hybriden . . . . .	528
1. Feinstruktur und Fragmentation . . . . .	528
2. Intra-individuelle zahlenmäßige Instabilität . . . . .	530
a) Instabilität in Wurzel und Sproß . . . . .	534
b) Instabilität im ♂ und ♀ Archespor . . . . .	536
3. Verhalten während der Meiose . . . . .	538
4. Verhalten im Gametophyt und Vererbung . . . . .	541
E. Diskussion . . . . .	543
1. Struktur und Entstehung akzessorischer Chromosomen . . . . .	543
2. Direkte Selbstregulierung der Zahl akzessorischer Chromosomen . . . . .	545
Summary . . . . .	549
Literatur . . . . .	551

### A. Einleitung

Die vorliegende Arbeit bildet ein Glied in einer Reihe von zusammengehörigen Beiträgen, deren Ziel die Aufklärung der Mechanismen der Mikro-Evolution in einem Komplex von nahverwandten Diploiden und Polyploiden ist (SCHNEIDER 1958, EHRENDORFER, 1959a, b, d, e, 1960b und in Vorbereitung).

Im Zuge von cytologischen Vorarbeiten an Sippen des *Achillea millefolium*-Komplexes wurden bei der diploiden Kleinart *A. asplenifolia* und ihren Hybriden akzessorische (oder B-)Chromosomen aufgefunden (EHRENDORFER 1957, SCHNEIDER 1958). Diese interessante Sonderklasse von Chromosomen ist anscheinend viel weiter verbreitet, als ursprünglich angenommen wurde (DARLINGTON und WYLIE 1955) und findet in letzter Zeit steigende Beachtung (vgl. die Sammelreferate MÜNTZING 1958, 1959 und Hinweise bei TISCHLER 1953—1957 und DARLINGTON 1956 für Pflanzen sowie WHITE 1954 für Tiere).

An *Achillea* sollten nun vor allem bisher weniger berücksichtigte Punkte bezüglich der phylogenetischen Bedeutung der akzessorischen Chromosomen aufgeklärt werden. Der vorliegende Beitrag behandelt dabei im wesentlichen cytologische Probleme:

1. Bestehen Unterschiede in der Häufigkeit akzessorischer Chromosomen bei diploiden und polyploiden Sippen?

2. Wie entstehen akzessorische Chromosomen?

3. In welcher Weise unterscheiden sich die akzessorischen Chromosomen in Struktur und cytologischem Verhalten von Standard-Chromosomen?

4. Beeinflussen spezifische Cyto-Mechanismen die Zahl der akzessorischen Chromosomen im somatischen Bereich bzw. im Gametophyt?

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden cytologische Analysen von 186 Wildformen des *Achillea millefolium*-Komplexes aus Europa und Nordamerika und von 325 experimentellen Hybriden durchgeführt. Wegen Einzelheiten der Kreuzungsversuche und deren Auswertung im Hinblick auf Vererbung und Auswirkungen akzessorischer Chromosomen sei auf Beitrag VI (EHRENDORFER 1960 b) verwiesen.

Für die großzügige Gewährung von Arbeitsmöglichkeiten am Botanischen Institut der Universität Wien gilt mein Dank Herrn Prof. L. GETTLER. Frau Prof. E. WOESS sei herzlich bedankt für wertvolle Hinweise, Rat und Hilfe in cytologischen Belangen.

## B. Material und Methodik

Die Pflanzen für die vorliegende Untersuchung wurden zum kleineren Teil im Gelände fixiert, zum größeren Teil nach Verpflanzung oder Anzucht aus Samen im Botanischen Garten der Universität Wien (HBV) unter gleichartigen Umweltbedingungen in Feldkultur gehalten. Die Kennzeichnung erfolgt jeweils durch Fundort bzw. Serien-Nummer (für die einzelnen Populationen bzw. Nachkommenschaften) und Fixierungsnummer bzw. Individuen-Nummer (für die Einzelpflanzen), z. B. 72—118.

Bei der cytologischen Untersuchung der somatischen Chromosomen wurden teils Altpflanzen, teils Jungpflanzen im 2—3-Blattstadium herangezogen. Rhizomabschnitte von Altpflanzen wurden im feucht-warmen Stecklingskasten vorgezogen, um starkwüchsige Wurzelspitzen und junge Blattanlagen zu erhalten. Für die Anreicherung der in Teilung befindlichen Kerne, die Auflockerung der Teilungsfiguren und die Kontraktion der Chromosomen hat sich sowohl bei Rhizomstücken der Altpflanzen als auch bei Jungpflanzen eine 4stündige Vorbehandlung in 0,25%iger Colchizinklösung sehr bewährt; dabei treten noch keine Schädigungen oder C-bedingte tetraploide Zellen auf. Die Weiterverarbeitung erfolgte über Alkohol-Eisessig (3:1)-Fixierung und Kochen in Karminessigsäure zu Quetschpräparaten.

Im generativen Bereich wurden junge Blütenköpfchen bzw. Einzelblüten ohne C-Vorbehandlung in Carnoy (4:3:1) fixiert. Nach leichter Erwärmung in Karminessigsäure und mäßigem Quetschen der Antheren ergeben sich gute Bilder von PMZ-Meiosen (und Mitosen).

Struktur und Verhalten der akzessorischen Chromosomen der diploiden *Achillea asplenifolia* (= a) wurden vor allem in Hybridnachkommenschaften aus dieser Art



und der ebenfalls diploiden *A. setacea* (=s) genauer untersucht. Bei den reziproken  $F_1$ -Serien  $64(s \times a)$  und  $72(a \times s)$  wurde eine  $a$ -Pflanze mit instabiler Zahl akzessorischer Chromosomen verwendet (vgl. S. 526). Dadurch konnten  $F_1$ -Individuen mit 0, 1, 2, 3, 4 und 6 akzessorischen Cheomosomen, sonst aber mit weitgehend einheitlichem Idiotypus hergestellt werden. Neben  $F_2$ -Serien aus der Kreuzung bestimmter  $F_1$ -Einzelpflanzen wurden nach freiem Abblühen in einem Isolationstest aus dieser  $F_1$  zahlreiche  $f_2$ -Serien gewonnen. In diesem Versuch wurden die diploiden  $F_1$  zusammen mit pentaploiden  $F_1$  (aus *Achillea collina*-4x und *A. millefolium*-6x) isoliert. Die  $f_2$ -Nachkommenschaften aus  $a \times s$ - $F_1$ -Mutterpflanzen haben verschiedene Chromosomenzahlen, aus denen sich erkennen läßt, ob an ihrer Entstehung diploide oder pentaploide Vaterpflanzen bzw. reduzierte oder unreduzierte Eizellen beteiligt waren. — Über methodische Einzelheiten der genetischen Untersuchungen an akzessorischen Chromosomen bei *Achillea* informiert Beitrag VI (EHRENDORFER 1960b).

### C. Akzessorische Chromosomen bei verschiedenen diploiden (und polyploiden) Wildsippen

Bei *Achillea* sind vor allem auf der Diploid-Stufe Individuen häufig, bei denen besonders in der frühen Prophase der Meiose eine verstärkte spontane Chromosomenaberrationsrate in Erscheinung tritt (EHRENDORFER 1959b). Da im Zuge dieser Aberrationen auch zentrische Fragmente entstehen, ergibt sich die Frage nach einer entsprechenden Abgrenzung gegen akzessorische Chromosomen. Vorgeschlagen sei folgende begriffliche Kennzeichnung: Akzessorische Chromosomen sind gegenüber den Normalchromosomen des jeweiligen Standard-Karyogramms strukturell differenziert und daher ohne meiotische Paarungsaffinität mit den Normalchromosomen; nach Entstehung und Gameten-Zygoten-Passage treten sie als überzählige Elemente zum Standard-Karyogramm hinzu; ihre Zahl ist inter-individuell (bei verschiedenen Individuen einer Population) und teilweise auch intra-individuell (bei verschiedenen Zellen eines Individuums) variabel.

Akzessorische Chromosomen wurden bisher bei 8 von 186 daraufhin untersuchten Individuen von Wildsippen<sup>1</sup> des *Achillea millefolium*-Komplexes und einiger verwandter Arten festgestellt (das sind 4,3%); davon gehören 7 der Diploid- und nur 1 der Tetraploidstufe an, was 16,3 bzw. 1,2% der untersuchten Diploiden (43) bzw. Tetraploiden (81) entspricht; trotz eingehender Untersuchungen wurden bisher akzessorische Chromosomen bei keiner einzigen der 58 analysierten Hexa- und Oktaploiden festgestellt. Damit ergibt sich eine auffällig ungleichmäßige Verteilung zwischen Diploiden und Polyploiden und eine bemerkenswerte Parallele mit der ähnlich ungleichmäßigen Verteilung von Individuen mit erhöhter spontaner Chromosomenaberrationsrate (EHRENDORFER 1959d).

<sup>1</sup> Die sehr viel zahlreicheren Feststellungen von akzessorischen Chromosomen an experimentell hergestellten Nachkommenschaften sind hier nicht miteingerechnet!

Im einzelnen liegen Befunde über akzessorische Chromosomen für folgende Kleinarten von *Achillea* vor (wegen der allgemeinen Kennzeichnung dieser Sippen sei vor allem auf EHRENDORFER 1953 verwiesen!): *A. crithmifolia* W.K. (2x; südosteuropäisch-balkanisch; nicht unmittelbar der phylogenetischen Basis des *A. millefolium*-Komplexes angehörend), *A. asplenifolia* Vent. (2x; mittel- bis südosteuropäisch-pannonisch, *A. roseo-alba* Ehrendf. (2x, vereinzelt auch 4x; Ebenen bis Bergstufe des Alpeninnenrandes; Introgressionssippe aus *A. asplenifolia*  $\times$  *A. setacea*; EHRENDORFER 1959a, e) und *A. collina* Beck. (4x; europäisch-kontinental; Allotetraploide aus *A. asplenifolia* und *A. setacea*; EHRENDORFER 1959e). — Morphologische Unterschiede zwischen Individuen mit und ohne akzessorische Chromosomen konnten in keinem Falle festgestellt werden.

Wichtig für ein Verständnis der Genese der akzessorischen Chromosomen sind die cytologischen Verhältnisse, wie sie in den Populationen von *A. crithmifolia* in Jugoslawisch- und Griechisch-Makedonien angetroffen wurden. Hier finden sich neben  $\pm$  aberrationslabilen 2x- (und vereinzelt auch 3x-) Individuen (EHRENDORFER 1959b) auch solche mit heteromorphen Bivalent-Chromosomen und akzessorischen Chromosomen. Bei Rudnik-fix. 16 und einer Schweslerpflanze (HBV: Alpinum) sind 8 Paare von Normalchromosomen homomorph, ein Paar aber ist stark heteromorph und in der MI der Meiose nur selten gepaart (Abb. 1a). Besonders auffällig sind bei dieser Pflanze intra-individuelle Zahlen-schwankungen, die dadurch zum Ausdruck kommen, daß Elemente des abweichenden Paares in manchen PMZ überhaupt fehlen, in anderen aber überzählig auftreten. Bei Uroševac-fix. 12 findet sich nun in etwa 30% der PMZ zusätzlich zu einem durchaus normalen Standard-Karyogramm (9 Bivalente) ein Chromosom, das größtmäßig dem kleineren Element des heteromorphen Paares von Rudnik-fix. 16 entspricht (Abb. 1b, c). Dieses Zusatzelement ist offensichtlich einer gewissen somatischen Reduktion ausgesetzt und tritt demnach nicht in allen PMZ auf; auch in der Meiose wird es öfters als Mikronucleus eliminiert. Da es mit Normalchromosomen niemals Trivalente bildet, muß es bereits als akzessorisches Chromosom bezeichnet werden. Eine unmittelbar vorhergegangene Entstehung durch Chromosomenaberrationen ist auszuschließen, da die Trägerpflanze keine weiteren cytologischen Abnormitäten aufweist.

In der genauer untersuchten Population Weiden-Podersdorf von *A. asplenifolia* wurden bisher von 16 untersuchten Individuen bei 3 akzessorische Chromosomen angetroffen. 192-3 hat 2 (SCHNEIDER 1958: Abb. 1a), PW-II/2a ist somatisch instabil mit 1—0 akzessorischem Chromosom. PW-I, die Mutterpflanze für die  $a \times s$ - und  $s \times a$ -Hybriden (Serie 64 und 72) produzierte Pollen mit 0 bzw. 2 und Eizellen mit 0, 1,

2, 3, 4 und 6 (?) akzessorischen Chromosomen (vgl. Tabelle 2), ist also extrem irregulär, wobei als Primärzahl am ehesten 1 anzunehmen ist. Eine ausführliche Behandlung der akzessorischen Chromosomen von *A. asplenifolia*, wie sie in den F<sub>1</sub>-Hybriden mit *A. setacea* in Erscheinung treten, findet sich in den folgenden Abschnitten.

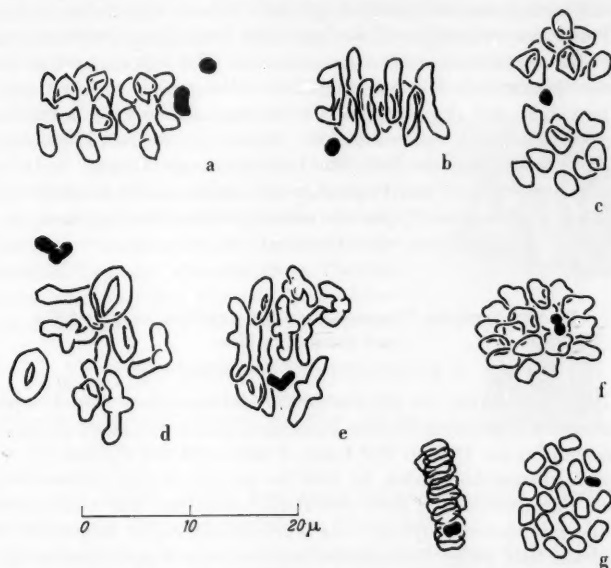


Abb. 1a—g. Akzessorische Chromosomen in der Pollenmeiose bei verschiedenen *Achillea*-Arten. *A. crithmifolia*: a frühe A I, 8 II (in Teilung), ein heteromorphes, nichtgepaartes Chromosomenpaar (Rudnik-fix. 16); b, c ein univalentes akzessorisches Chromosom in M I bzw. A I (Uroševac-fix. 12); *A. roseo-alba*: d, e akzessorisches Chromosom-Bivalent bzw. Univalent in früher M I (Pontebba-fix. 8, intra-individuelle Instabilität der Zahl der akzessorischen Chromosomen); *A. collina*: f, g M I mit akzessorischem Chromosomen-Bivalent, M II, Normalverteilung (Lipljan-fix. 15)

Bei *A. roseo-alba* wurden akzessorische Chromosomen in den Populationen Pontebba bei den Individuen 2—18 und fix. 8 angetroffen, ferner in der Population Wallis, Stalden-Saas, fix. 9. Alle diese Individuen weisen intra-individuelle Instabilität für diese Chromosomen auf. In der Pontebba-Population sind sie größer als bei *A. asplenifolia*, Weiden-Podersdorf. Bei fix. 8 finden sich in den PMZ 2, seltener auch nur 1 oder gar keine überzähligen (Abb. 1d, e), 2—18 ist mit 1 akzessorischen Chromosom noch stärker labil. Stalden-Saas, fix. 9, hat ebenfalls ein — allerdings kleineres — akzessorisches Chromosom, das sich in der Anaphase I vielfach stark verspätet oder gar nicht teilt.

Der einzige Beleg für die tetraploide *A. collina* stammt aus der Population Lipljan (Jugoslawisch-Makedonien), fix. 15. Dieses Individuum hat 2, offensichtlich stabile akzessorische Chromosomen, die größtmäßig den von *A. asplenifolia* entsprechen, in der Metaphase I der Pollenmeiose meist ein Bivalent bilden und in der Anaphase II normal verteilt werden (Abb. 1f, g).

Trotz des vorläufigen Charakters der bisherigen Untersuchungen über die akzessorischen Chromosomen bei Wildsippen von *Achillea* können demnach doch schon einige Feststellungen als gesichert gelten: 1. Individuen mit akzessorischen Chromosomen gehören zum regulären Populationsbestand vieler diploider Sippen; 2. in den Populationen fungiert immer nur ein Teil der Individuen als Träger; 3. bei den verschiedenen Sippen und Populationen handelt es sich zumindest teilweise um verschiedene Typen von akzessorischen Chromosomen; 4. die Zahl der akzessorischen Chromosomen ist intra-individuell vielfach instabil.

### D. Akzessorische Chromosomen bei *Achillea asplenifolia* und ihren Hybriden

#### 1. Feinstruktur und Fragmentation

Die Feinstruktur der akzessorischen Chromosomen von *A. asplenifolia* aus der Population Weiden-Podersdorf konnte vor allem an Hybridnachkommen der Pflanze WP-I mit *A. setacea* in der F<sub>1</sub>-Serie 72:  $a \times s$  genauer untersucht werden. In Abb. 2a und 3a ist eine größere Anzahl dieser Chromosomen in ihrer Standard-Ausbildung aus verschiedenen Stadien mitotischer Prophasen der Wurzelspitzenregion dargestellt; zum Vergleich sind einige Normalchromosomen aus entsprechenden Zellen beigelegt. Über das Aussehen von akzessorischen Chromosomen und normalen Chromosomen in C-Mitosen informieren Abb. 2b und 4a. Das Längenverhältnis zwischen akzessorischen und normalen Chromosomen liegt zwischen 1:2 und 1:4, im Durchschnitt bei etwa 1:3. Weiter waren Analysen ungepaarter bzw.  $\pm$  vollständig gepaarter akzessorischer Chromosomen in meiotischen Prophasen (Pachytän) möglich (Abb. 3b). Die Analysen zeigen, daß der Standardtyp ein submedianes Centromer mit schwach angedeuteter Chromomerenstruktur aufweist; gegenüber der Struktur der Centromeren an den Normalchromosomen sind keine Unterschiede feststellbar. Das Centromer ist bei den akzessorischen Chromosomen von zwei deutlich hervortretenden proximalen heterochromatischen Regionen flankiert. Der kürzere Arm ist stark heterochromatisch, mit einem schwächeren interstitiellen und einem stärkeren zweigliedrigen terminalen Abschnitt. Der längere Arm hat interstitielle euchromatische und kleinere heterochromatische Abschnitte sowie einen deutlich hervortretenden heterochromatischen End-

Abschnitt. Die akzessorischen Chromosomen bestehen demnach überwiegend aus Heterochromatin, aber auch aus Euchromatin. Dieser Befund wird auch durch die Analyse der aus ihnen bestehenden Mikronuclei in Tetraden und Pollenkörnern bestätigt (vgl. Abb. 5k).

Obwohl die Normalchromosomen noch keiner detaillierten Prophase-Analyse unterzogen worden sind, kann doch schon jetzt mit Sicherheit festgestellt werden, daß sie relativ viel weniger Heterochromatin besitzen und daß keines der Normalchromosomen der diploiden *A. asplenifolia* (bzw. *A. setacea*) im weiteren Centromer-Bereich eine mit dem Aufbau der akzessorischen Chromosomen übereinstimmende Struktur aufweist. Immerhin ist aber doch bemerkenswert, daß auch viele Normalchromosomen die Anordnung von proximalem und terminalem Heterochromatin besitzen (Abb. 3a!). Da der Standard-Typ der akzessorischen Chromosomen kürzer als das kürzeste Normalchromosom ist, wäre seine Entstehung demnach



Abb. 2a u. b. Akzessorische Chromosomen von *A. asplenifolia*: a mitotischer Prophasekern, → akzessorisches Chromosom ( $a \times s-F_1$ ; 72—134—1); b akzessorische Chromosomen und 2 Normalchromosomen aus einer leicht C-beeinflußten Mitose im Wurzelspitzenbereich ( $a \times s-F_1$ ; 72—114—17);  $\times 2900$

zwar nicht direkt durch terminale, wohl aber durch interstitielle Deletionen aus Normalchromosomen vorstellbar.

Die bisherigen Analysen der Struktur der akzessorischen Chromosomen der *A. asplenifolia* WP-I und ihrer Hybrid-Nachkommen belegen, daß es sich hier fast ausschließlich um den im vorigen geschilderten Standard-Typ handelt. Nur ganz vereinzelt wurden in diesen Nachkommenschaften auch noch winzige Fragment-Chromosomen beobachtet (Abb. 4a—c). Da diese Elemente bei Individuen auftreten, bei denen keine spontanen Chromosomen-Aberrationen der Normalchromosomen festgestellt wurden, ist es nicht wahrscheinlich, daß sie unmittelbar aus solchen hervorgegangen sind. Andererseits zeigen diese Fragment-Chromosomen öfter eine gewisse meiotische Affinität zum Standardtyp der akzessorischen Chromosomen. Daher liegt die Annahme nahe, daß sie durch Fragmentation, eventuell durch Fehlteilung des Centromers (vgl. Abb. 4a, rechts oben) aus diesem Standardtyp entstanden sind. Die Fragment-Chromosomen treten sowohl in Mitosen der Wurzelspitze als auch in meiotischen Metaphasen, aber meist nur in einzelnen Zellen auf; ihre Vermehrungsfähigkeit scheint also beschränkt zu sein. Die Seltenheit solcher Fragment-Chromosomen

zeigt daß die akzessorischen Chromosomen von *A. asplenifolia* gegen Brüche und strukturelle Umbauten nur mäßig, aber doch stärker anfällig als die Normalchromosomen sind.

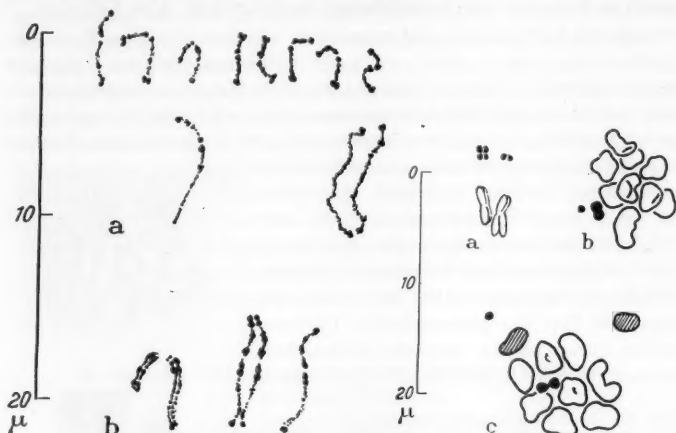


Abb. 3

Abb. 4

Abb. 3 a u. b. Feinstruktur der akzessorischen Chromosomen von *A. asplenifolia*: a mitotische Prophasen im Wurzelspitzenbereich, frühere und spätere Stadien, oben akzessorische Chromosomen, unten Normalchromosomen, jeweils auch den gleichen Kernen zum Vergleich ( $a \times s-F_1$ ; 72—134—1); b meiotische Prophasen (Zygotän-Pachytän, PMZ), eng bzw. locker gepaarte Bivalente, Univalent (96—13, 72—128, 72—114)

Abb. 4 a—c. Winzige, instabile Fragment-Chromosomen aus akzessorischen Chromosomen von *A. asplenifolia*: a Standardtyp des akzessorischen Chromosoms und (?) telozentrisches Fragment-Chromosom, 2 Normalchromosomen, C-Mitose (Wurzelspitzenbereich) ( $a \times s-F_1$ ; 72—143—26); b, c Pollenmeiose, M I, 2 akzessorische Chromosomen (Standardtyp), jeweils als Bivalente, einzelne Fragmentchromosomen, in c 2 ungepaarte Homologe (schraffiert) ( $a \times s-F_1$ ; 72—114, 72—143)

## 2. Intra-individuelle zahlenmäßige Instabilität

Schon bei den vorläufigen Untersuchungen war an bestimmten Wild- und Hybrid-Individuen von *Achillea* in somatischen Mitosen und in der Pollenmeiose eine intra-individuelle Instabilität der Zahl akzessorischer Chromosomen festgestellt worden (EHRENDORFER 1957, SCHNEIDER 1958); dabei ergaben sich auch gewisse Parallelen zu der intra-individuellen Aneuploidie der Normalchromosomen bei aberrationslabilen Individuen (EHRENDORFER 1959 b). Auf die Bedeutung der Instabilität der Zahl akzessorischer Chromosomen bei Wildsippen wurde bereits hingewiesen (S. 526—528). Im folgenden sollen die Ergebnisse von weiterführenden Untersuchungen an einem wesentlich reicheren Material experimentell hergestellter Formen dargestellt werden, wobei vor allem die Frage nach Richtung und Ursache der intra-individuellen Zahlenvariationen im Vordergrund stehen soll.

Als Material (vgl. auch S. 524) für die Mitose-Untersuchungen standen 83 Keimlinge ( $f_2$  aus 15  $F_1$ :  $a \times s$ , Serie 72 und  $s \times a$ , Serie 64) im 2–4-Blattstadium und Wurzelspitzen von verschiedenen Rhizomen von 19 Altpflanzen ( $F_1$  aus  $a \times s$ , Serie 72 und  $s \times a$ , Serie 64), beide nach Colchizin-Vorbehandlung, zur Verfügung. Die C-Vorbehandlung liefert meistens ganz ausgezeichnet übersichtliche cytologische Bilder von ersten C-Mitosen. Für jedes Individuum wurden aus mehreren Wurzelspitzen, vielfach zusätzlich auch aus Vegetationspunkten und Blattanlagen, mindestens 5, bei Verdacht auf Instabilität mindestens 10 (z. T. bis 25) einwandfreie C-Mitosen genau durchanalysiert (vgl. EHENDORFER 1960b, Abb. 1). Für die Erfassung der Zahl der akzessorischen Chromosomen in PMZ wurden jeweils mindestens 50 PMZ von Blüten aus verschiedenen Köpfchen und verschiedenen Infloreszenzweigen von 17 Altpflanzen ( $F_1$  aus  $a \times s$  und  $s \times a$ ) analysiert.

Der erste Schritt zur Klärung der Instabilität der Zahl der akzessorischen Chromosomen muß die Feststellung der Primärzahl (Zygoten-zahl) sein; dabei wurde nach folgenden Prinzipien vorgegangen:

a) Bei Keimlingen wird zumeist die in verschiedenen Wurzelspitzen (bzw. in der Sproßregion) am weitesten verbreitete Zahl die Primärzahl sein, während Zahlen, die nur in einzelnen Wurzelspitzen, an lateralen Blattabschnitten oder gar nur in einzelnen Zellen oder Zellgruppen auftreten, als abgeleitet und sekundär zu betrachten sind.

b) Bei Altpflanzen erlaubt die Erfassung der häufigsten Zahl im Wurzel- und PMZ-Bereich Rückschlüsse auf die Primärzahl. Weitere Hinweise ergeben sich aus einer kritischen Mitberücksichtigung der Zahlen in den Eizellen (vgl. S. 542)<sup>1</sup>.

Mit diesen Prinzipien gelang bei allen  $f_2$ -Keimlingen und der Mehrzahl der  $F_1$ -Altpflanzen eine eindeutige Festlegung der Primärzahl der akzessorischen Chromosomen, da sich die Instabilität der Zahlen hier in mäßigen Grenzen hält; nur bei wenigen, besonders stark labilen Altpflanzen, besonders 72–121, kann das Vorliegen einer anderen als der angenommenen Primärzahl wohl nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 1 (Keimlinge) und 2 (Altpflanzen) in übersichtlicher Form zusammengestellt.

Da sich die Instabilität der Zahl und die Richtung der Zahlenänderungen bei den akzessorischen Chromosomen im somatischen Bereich (a) und im Archespor (b) unterscheiden, sollen die entsprechenden Phasen im folgenden getrennt behandelt werden.

<sup>1</sup> Keine Rückschlüsse auf die Primärzahl lassen sich aus EZ-Werten bei Individuen mit ungeraden Zahlen von akzessorischen Chromosomen ziehen: sie weisen infolge ungleichmäßiger Verteilung der akzessorischen Chromosomen während der Meiose unterschiedliche Zahlen in den EZ auf. Wo in solchen Fällen keine Hinweise auf eine spezifische Instabilität im ♂ bzw. ♀ Archespor gegeben sind, wurden die entsprechenden Individuen bei der Bewertung in Tabelle 2 als „stabil“ eingestuft.



Tabelle 1. *Stabile (stab.) bzw. instabile (inst.) Zahlen von akzessorischen Chromosomen in Wurzel- und Sproßregion von  $f_2$ -Keimlingen.*  
 Getrennt nach ihren  $F_1$ -Mutterpflanzen sind die jeweiligen Zahlen von untersuchten  $f_2$ -Keimlingen angeführt; bei den Instabilen stehen Primärzahl  $\rightarrow$  Sekundärzahl(en) der akzessorischen Chromosomen in Klammer; Keimlinge mit \* haben polyploide Vaterpflanzen, alle übrigen sind diploid. (Weitere Erklärungen im Text.)

$F_1$	n	Anzahl von $f_2$ -Pflanzen											
		Primärzahl der akzessorischen Chromosomen											
		1		2		3		4		5		6	
		stab.	inst.	stab.	inst.	stab.	inst.	stab.	inst.	stab.	inst.	stab.	inst.
$s \times a$ , Serie 64	12	2											
	113			2*		3		1					
		3	2(1 $\rightarrow$ 0)										
	10												
	5	4											
	4	3											
$s \times s$ , Serie 12	121	2		1*		2							
	122												
		1*											
	5	5											
	134	6		3		1							
	137	9		7		3							
$s \times s$ , Serie 12	143	3		2									
	145	6											
	149	3		1									
						1(3 $\rightarrow$ 1)							
instab.		28	3	22	—	9	2	3	3	1	2	—	2
		9,7%		0,0%		18,2%		50,0%		66,7%			100,0%

Tabelle 2. Zahlen von akzessorischen Chromosomen in Wurzel, Pollenmutterzellen (PMZ; a = verschiedene Zahlen im gleichen Fach, b = in verschiedenen Fächern) und Eizellen (EZ) von Altpflanzen ( $F_1$  aus  $s \times a$  und  $a \times s$ ). Primärzahl  $\rightarrow$  Sekundärzahl(en); häufigste

Tabelle 2. Zahlen von akzessorischen Chromosomen in Wurzel, Pollenmutterzellen (PMZ;  $a =$  verschiedene Zahlen im gleichen Fach,  $b =$  in verschiedenen Fächern) und Eizellen (EZ) von Altpflanzen ( $F_1$  aus  $s \times a$  und  $a \times s$ ). Primärzahl  $\rightarrow$  Sekundärzahl(en), häufigste Zahlen unterstrichen; — nicht untersucht; Stabilität/Instabilität in Wurzel und Sproß (im wesentlichen Reduktion) und im  $\delta + \varnothing$  Archespore (im wesentlichen Akkumulation.) (Weitere Erklärungen im Text.)

F <sub>1</sub>	Akzessorische Chromosomen				Stabilität/Labilität	
	Wurzel (2n)	PMZ (2n)	EZ (n)	Primärzahl	Wurzel und Sproß	$\delta + \varnothing$ Archespore
$s \times a$ , Serie 64	—12	0	0	0	stab.	$\varnothing + \delta$ stab.
	—13	0	0	0	stab.	$\varnothing + \delta$ stab.
	—11	2	1	2	stab.	$\varnothing$ stab.
	—118	0	0	0	stab.	$\varnothing$ stab.
$a \times s$ , Serie 72	—113	1	$\underline{1}, 2, 3, 4$ (0 fehlt!)	1	schwach inst.: Reduktion	$\delta$ stab. (?) $\varnothing$ inst.
	—114	1	$\underline{1}, 2, (?)$ (0 fehlt?!)	1	stab.	$\varnothing + \delta$ inst.
	—131	1	$\underline{1}, (...?)$	1	stab.	$\delta$ inst.
	—134	1	$\underline{1}, (...?)$ (0 fehlt?!)	1	stab.	$\varnothing$ inst.
$a \times s$ , Serie 72	—122	2	$\underline{0}, \underline{1}$	2	schwach inst.: Reduktion	$\delta + \varnothing$ stab.
	—129	2	$\underline{0}, \underline{1}$	2	maßig inst. stab.	$\delta + \varnothing$ stab.
	—135	2	—	2	stab.	—
	—137	2	1	2	stab.	$\varnothing$ stab.
	—139	2	1	2	stab.	$\varnothing + \delta$ stab.
	—143	2	1	2	stab.	$\delta$ stab.
	—147	2	1	2	stab.	$\varnothing + \delta$ stab.
	—149	2	1	2	stab.	$\varnothing + \delta$ stab.
	—150	2	—	2	stab.	$\varnothing$ stab.
	—120	3	(0?), 1, 2	3	stab. (oder schwach inst.?)	$\varnothing$ stab.
	—138	3	1, 2	3	stab.	$\varnothing$ stab.
	—144	3	—	3	schwach inst.	$\delta$ stab.
$a \times s$ , Serie 72	—145	3	(0?), 1, 2	3	schwach inst. (?)	$\delta + \varnothing$ stab.
	—119	$\underline{0} \rightarrow \underline{4} \rightarrow \underline{3} \rightarrow \underline{1}$	$\dots \rightarrow \underline{2} \rightarrow \underline{1}$ (b)	4	stark inst.	$\delta$ stab.
	—121	$\underline{6} \rightarrow \underline{5} \rightarrow \underline{4} \rightarrow \underline{2} \rightarrow \underline{1}$	$\dots \rightarrow \underline{2} \rightarrow \underline{1}$ $\rightarrow \underline{3} \rightarrow \underline{5}$ (a)	6(?)	stark inst.	$\delta$ schwach inst.: Reduktion und Akkumulation (?)
	—127	$\dots \rightarrow \underline{2} \rightarrow \underline{1}$	$\pm \rightarrow \underline{2}$ (a) $\underline{4} \rightarrow \underline{3}$ (a)	4(?)	stark inst.	$\varnothing$ stab.
—128	—	—	0, 1 0, 1	4	stark inst.	$\delta$ (?) und $\varnothing$ stab. $\delta$ (?) und $\varnothing$ stab.

## a) Instabilität in Wurzel und Sproß

Bei den  $f_2$ -Jungpflanzen macht sich die Instabilität im vegetativen Bereich meist nur im Vorkommen von abweichenden Zahlen akzessorischer Chromosomen in einzelnen Zellen oder Zellengruppen, manchmal aber auch schon in ganzen Seitenwurzeln bemerkbar. Acht genauer untersuchte Pflanzen ohne akzessorische Chromosomen aus den  $f_2$ -Serien 72—118, —122 und —127 (in Tabelle 1 nicht aufgenommen) waren absolut stabil. Die prozentuelle Verteilung von Stabilen und Instabilen für die einzelnen Klassen von Primärzahlen akzessorischer Chromosomen ergibt eine klare Zunahme der Instabilität mit zunehmender Primärzahl. Auffällig ist das Fehlen von Instabilen unter den Individuen mit 2 akzessorischen Chromosomen, wo auf Grund des Kurvenverlaufes etwa 13% Instabile zu erwarten wären.

Bei den Altpflanzen ( $F_1$ ) ist die Instabilität der Zahl der akzessorischen Chromosomen in Wurzel und Sproß vielfach verstärkt. So treten etwa in der sonst weitgehend stabilen Gruppe von  $F_1$ -Pflanzen mit 2 akzessorischen Chromosomen bei 72—129 vereinzelte Antherenfächer ohne akzessorische Chromosomen auf; auch bei  $F_1$  mit 1 akzessorischen Chromosom (72—113) und mit 3 akzessorischen Chromosomen (72—114) ist fachweise Reduktion auf 0 bzw. 2 akzessorischen Chromosomen festzustellen. Besonders extrem sind die Schwankungen bei Individuen mit hoher Zahl von akzessorischen Chromosomen, wo im Wurzelbereich und den Infloreszenzen z. T. starke Unterschiede bestehen (etwa bei 72—119, —121). Im wesentlichen ergibt sich damit auch bei den Altpflanzen eine klare Abhängigkeit der Instabilität von der zunehmenden Primärzahl.

Zusammenfassend kann demnach für Jung- und Altpflanzen unserer  $a \times s$ -Nachkommenschaften festgestellt werden: mäßige Instabilität bei 1, weitgehende Stabilität bei 2, fortschreitende Instabilität bei 3 und mehr akzessorischen Chromosomen; alle bisher angetroffenen Altpflanzen mit 4 oder mehr und alle Jungpflanzen mit 6 akzessorischen Chromosomen sind instabil. Im Zusammenhang mit der Frage nach der Ursache der zahlenmäßigen Stabilität bzw. Instabilität der akzessorischen Chromosomen bei *Achillea* muß auf folgende Tatsachen hingewiesen werden: 1. Bei allen untersuchten Pflanzen sind die akzessorischen Chromosomen identisch, sie stammen alle von einer Mutterpflanze. 2. Die Einordnung der akzessorischen Chromosomen in diploide oder polyploide Genome bei den  $f_2$ -Jungpflanzen ist ohne Einfluß auf Stabilität bzw. Instabilität. 3. Die untersuchten  $F_1$ - und  $f_2$ -Individuen sind Geschwister- bzw. Halbgeschwisterpflanzen; damit scheiden andere idiotypische Faktoren als die akzessorischen Chromosomen selber als Ursache für die Verschiedenheiten der Zahlenstabilität mehr-minder aus. Die akzessorischen Chromosomen steuern also offensichtlich durch ihre

*Quantität rückwirkend auch ihre eigene zahlenmäßige Stabilität oder Instabilität bzw. ihr normales oder anormales Verhalten in den somatischen Mitosen.*

Allgemein kann für die Zahlenveränderungen der akzessorischen Chromosomen im somatischen Bereich bei den instabilen Jung- und Altpflanzen festgestellt werden, daß es sich hier ganz überwiegend um *Reduktion* handelt; die wenigen Fälle, in denen eine Zunahme der Zahlen belegt werden konnte, beziehen sich immer nur auf einzelne Zellen (z. B.  $F_1$ : 72—119,  $f_2$ : Serie 72—113).

Der Zeitpunkt der somatischen Reduktion der Zahl der akzessorischen Chromosomen ist verschieden, aber offensichtlich meist mit der Intensität der Instabilität korreliert. Bei einer Pflanze aus der  $f_2$ -Serie 72—128 mit durchgehend  $42 + 1$  akzessorischen Chromosom (pentaploider Vater und unreduzierte Eizelle der diploiden Mutter mit verdoppeltem Chromosomensatz, also primär mit gerader Zahl von akzessorischen Chromosomen!) erfolgte die Reduktion offensichtlich bereits im frühesten Embryonalstadium; bei einer Jungpflanze aus der  $f_2$ -Serie 72—149 hatten die meisten Wurzeln 5, eine 4, der Vegetationspunkt und die Blattanlagen  $4 \rightarrow 3 \rightarrow 2$  akzessorische Chromosomen; bei einer Jungpflanze der  $f_2$ -Serie 72—114 mit 1 akzessorischen Chromosom traten nur in einer Wurzel ganz vereinzelte Zellen ohne akzessorische Chromosomen auf; bei den im wesentlichen stabilen Individuen mit 2 akzessorischen Chromosomen finden sich reduzierte Zellen ( $2 \rightarrow 0$  akzessorische Chromosomen) nur selten und dann erst in bestimmten Blütenabschnitten der Altpflanzen ( $F_1$ : 72—122, —129).

Die somatische Reduktion der Zahl der akzessorischen Chromosomen erfolgt weitgehend ungerichtet und ist in keiner Weise gewebe- oder organspezifisch. Auch die „Keimbahn“ (Blütensprosse usw.) erfährt in dieser Hinsicht keine Bevorzugung, wozu man etwa die fortschreitende Reduktion der Zahl der akzessorischen Chromosomen in PMZ und EZ bei den  $F_1$ -Pflanzen 72—119 und —121 vergleiche (Tabelle 2).

Eine parallele Instabilität von Normalchromosomen konnte trotz darauf gerichtetem Augenmerk in vielen Hunderten von Analysen nur 2mal beobachtet werden: bei 2  $f_2$ -Keimlingen aus Serie 72—137 (Einzelzellen mit  $18 \rightarrow 17$ ) und Serie 72—121 ( $44 \rightarrow 43$ ).

Da die Untersuchungen im somatischen Bereich ausschließlich an C-Mitosen erfolgten, war eine Aufklärung des Cyto-Mechanismus, welcher der Reduktion der Zahl der akzessorischen Chromosomen zugrunde liegt, nicht möglich. Immerhin verdient hervorgehoben zu werden, daß unter Tausenden von durchmusterten Zellen bei Instabilen neben dem Zellkern niemals Mikronuclei festgestellt werden konnten. Diese Tatsache und das vereinzelte Vorkommen von Zellen mit erhöhten Zahlen sprechen dafür, daß gelegentliche Non-Disjunction akzessorischer Chro-

mosomen und Zellkonkurrenz zuungunsten von Zellen mit vielen akzessorischen Chromosomen die Cyto-Mechanismen sind, die für die somatische Instabilität und die Reduktionstendenz der akzessorischen Chromosomen verantwortlich sind.

#### b) Instabilität im ♂ und ♀ Archespor

Die bei manchen Individuen in Erscheinung tretende verstärkte Instabilität im Archespor, die unter anderem in starken Schwankungen der Zahl der akzessorischen Chromosomen in den PMZ ein und desselben Antherenfaches zum Ausdruck kommt, wurde schon bei EHRENDORFER (1957) und SCHNEIDER (1958) erwähnt und durch Abbildungen belegt. Bei Individuen mit somatischer Reduktion der Zahl der akzessorischen Chromosomen sind dagegen im Infloreszenzbereich meist bestimmte Zahlen über größere Gewebsabschnitte bzw. ganze Pollenfächer einheitlich (z. B. 72—113, —129). Vergleicht man bei Individuen mit Instabilität im ♂ Archespor die Zahlen der akzessorischen Chromosomen der PMZ untereinander und mit denen im Wurzelbereich, so ergibt sich die Tatsache, daß hier — im Gegensatz zum somatischen Bereich — eine auffällige Tendenz zur *Akkumulation* von akzessorischen Chromosomen besteht.

Als Beispiel für derartige Instabilität im Archespor der Antheren sei 72—114, eine somatisch stabile Pflanze mit 1 akzessorischen Chromosom, angeführt. Während in manchen Antherenfächern alle PMZ nur 1 akzessorisches Chromosom aufweisen, sind daneben in anderen Fächern auch zerstreute PMZ mit höheren Zahlen von akzessorischen Chromosomen vorhanden. Das festgestellte Zahlenverhältnis bei 81 PMZ war:

akzessorische Chromosomen	1	2	3	4	5
Zahl von PMZ	68	5	1	6	1

Hier und bei anderen Archespor-Instabilen (etwa 72—131) ist die Häufung von *geraden* Zahlen von akzessorischen Chromosomen in den PMZ hervorzuheben.

Die Tendenz zur Akkumulation akzessorischer Chromosomen bei Individuen mit bloß einem einzigen akzessorischen Chromosom kommt vor allem auch auf der weiblichen Seite zum Ausdruck. Vergleicht man etwa 14  $f_2$ -Nachkommen aus  $F_1$ -Mutterpflanzen mit 1 akzessorischen Chromosom, deren Väter Pentaploide ohne akzessorische Chromosomen waren (Tabelle 3 in EHRENDORFER 1960b), so zeigt sich, daß hier in nicht einer einzigen Eizelle akzessorische Chromosomen fehlten, obwohl doch ohne Wirksamkeit eines speziellen Cyto-Mechanismus die Verteilung 50% ohne und 50% mit 1 akzessorischen Chromosom sein müßte. Statt dessen ist die Verteilung:

akzessorische Chromosomen	0	1	2	3	4
Eizelle(n)	—	9	3	1	1

Auch bei den diploiden  $f_2$ -Nachkommen dieser Mutterpflanzen mit 1 akzessorischen Chromosom ist ein auffälliger Überschuß an akzessorischen Chromosomen in den Eizellen festzustellen. Der Mittelwert für die Zahl der akzessorischen Chromosomen im Pollen der in Frage stehenden experimentellen  $F_1$ -Population ist 1,03 (vgl. S. 541), der Mittelwert für die nach freiem Abblühen aus den  $F_1$ -Individuen 113, 114, 131 und 134 (alle mit 1 akzessorischen Chromosom) hervorgegangenen 44 diploiden  $f_2$  ist 2,41 (vgl. Tabelle 3 und Tabelle 8 in EHRENDORFER 1960b). Nach der Zufallserwartung: Eizellen 50% mit einem und 50% ohne akzessorische Chromosomen, wäre nur ein Wert von 1,53 zu erwarten gewesen; statt 0,5 ist aber der Mittelwert für die Eizellen der Individuen mit 1 akzessorischen Chromosom tatsächlich mit  $2,41 - 1,03 = 1,38$  akzessorische Chromosomen anzunehmen. Nach der Zufallserwartung wären unter den 44  $f_2$  4—5 Individuen ohne akzessorische Chromosomen zu erwarten gewesen, tatsächlich fehlen sie hier ebenso wie bei den Nachkommenschaften mit pentaploiden Vätern. Hervorzuheben ist also, daß bei den  $a \times s$ - $F_1$  mit 1 akzessorischen Chromosom die Eizellen durchwegs mindestens 1, teils aber auch mehr (bis zu 4 akzessorische Chromosomen erhalten, wobei keine Häufung von geraden Zahlen gegeben ist. — Eine vergleichbare Instabilität auf der weiblichen Seite wurde auch für Wildformen, nämlich für die *A. asplenifolia*-Mutterpflanze WP-I unserer  $a \times s$ - und  $s \times a$ -Kreuzungen festgestellt (vgl. S. 526—527). — Da Belege für einen postmeiotischen Akkumulationsmechanismus zugunsten der präsumptiven Eizellen nicht vorliegen und auch ein bevorzugter Einschluß von univalenten akzessorischen Chromosomen in die zum ES werdende Makrospore während der Meiose nicht erkennbar ist (vgl. S. 541), bleibt für alle diese Gegebenheiten nur die Erklärung, daß auch hier die Anreicherung von akzessorischen Chromosomen schon im Archespor erfolgt.

Die Akkumulation akzessorischer Chromosomen im männlichen Antherenarchespor und im weiblichen Nucellusarchespor kann wohl nur durch einen Non-Disjunction-Mechanismus dieser Chromosomen während prämeiotischer Mitosen und einen darauffolgenden bevorzugten Einschluß der geteilten, aber noch zusammenhängenden akzessorischen Chromosomen in die präsumptiven PMZ und EMZ bedingt sein. Die cyto-mechanischen Voraussetzungen dafür wären in einer Asymmetrie der Zellteilungen und einer Asymmetrie der Bewegung der Telophasegruppen zu suchen. In der Literatur über die Embryologie bzw. Antherendifferenzierung der Angiospermen (SCHNARF 1929 usw.) finden sich für diese Annahme immerhin einige Anhaltspunkte. Mit dieser Annahme erklären sich auch die gehäuften geraden Zahlen von akzessorischen Chromosomen in den PMZ mit vermehrten Zahlen von akzessorischen Chromosomen. Eine bemerkenswerte Parallele zu diesem Vorgang stellt die Tendenz zur Akkumulation von Normalchromosomen in

den PMZ von aberrationslabilen, auch Non-Disjunction aufweisenden Diploiden dar (EHRENDORFER 1959b). — Im weiblichen Archespor werden offenbar durch einen entsprechenden Cyto-Mechanismus bei Individuen mit 1 akzessorischen Chromosom EMZ mit 2 (und bei Wiederholung auch mehr) akzessorischen Chromosomen gebildet; im Zuge normaler Mitosen und Embryosack-Mitosen entstehen dann Eizellen mit 1 (und mehr) akzessorischen Chromosomen, wobei natürlich keine Häufung gerader Zahlen feststellbar ist.

Während der Akkumulationsmechanismus auf der männlichen Seite nicht bei allen Individuen und dann auch nur mit einer gewissen intra-individuellen Labilität und nicht bei allen PMZ (72—114: 16%) in Erscheinung tritt, dürfte er auf der weiblichen Seite bei den in Frage stehenden  $F_1$ -Pflanzen mit 1 akzessorischen Chromosom mehr-minder ausschließlich erfolgen. Entsprechende Hinweise ergeben sich aus den reziproken Verschiedenheiten bei Kreuzung der instabilen *A. asplenifolia* WP-I mit *A. setacea*, wobei WP-I offensichtlich als Vater mehr Pollen ohne akzessorisches Chromosom, als Mutter dagegen z. T. Eizellen mit auffallend hohen Zahlen von akzessorischen Chromosomen produziert (vgl.  $F_1$  aus Tabelle 2).

Ein Blick auf die Tabelle 2 zeigt, daß die Akkumulationsphase der akzessorischen Chromosomen im Archespor bei  $a \times s$ -Hybriden bisher nur bei den 4  $F_1$ -Individuen mit einem akzessorischen Chromosom 72—113, —114, —131, —134 und, in schwacher Form, in PMZ der somatisch instabilen Pflanze 72—121 beobachtet werden konnte. Das differenzierte Verhalten verschiedener Individuen im Hinblick auf die Akkumulationsphase im Archespor ist also offensichtlich ebenfalls durch die Quantität der vorhandenen akzessorischen Chromosomen bestimmt, wenn auch in anderer Weise als in der somatischen Reduktionsphase.

### 3. Verhalten während der Meiose

In der Meiose sind Unregelmäßigkeiten im Verhalten der akzessorischen Chromosomen kaum gegeben; Formwechsel und Verteilung entsprechen hier weitgehend dem der Standard-Chromosomen. Schon ab der frühen Diakinese ist die Differenzierung in Eu- und Heterochromatin allgemein nicht mehr erkennbar. Die sonst für akzessorische Chromosomen mehrfach belegte verstärkte Allozyklie ist also bei *Achillea* nicht gegeben. Eine Paarung zwischen akzessorischen und Standard-Chromosomen konnte niemals festgestellt werden. — Bemerkenswert ist, daß sich bei univalenten akzessorischen Chromosomen relativ häufig die beiden Chromosomenarme miteinander paaren<sup>1</sup>. In PMZ der Pflanze

<sup>1</sup> Diese Tatsache zusammen mit der submedianen Inserierung der akzessorischen Chromosomen verleitete in der vorläufigen Mitteilung EHRENDORFER 1957 zu der irrigen Annahme, daß es sich um Isochromosomen handle.



72—114 (mit einem akzessorischen Chromosom) zeigen etwa 33% der akzessorischen Chromosomen eine derartige Schenkelpaarung (Abb. 5b). Offensichtlich handelt es sich hier um unspezifische Attraktion im Heterochromatin. Im übrigen verläuft die meiotische Syndese der akzessorischen Chromosomen recht normal. Bei Pflanzen mit 2 akzessorischen Chromosomen haben Stichproben ergeben, daß nur in 5—20% der PMZ die Paarung zu einem Bivalent unterbleibt und Univalente entstehen. Bei der  $F_2$ -Pflanze 96-4 mit 2 akzessorischen Chromosomen finden sich bei 50 PMZ 94% Bivalente, davon 72% mit einem, 22% mit zwei Chiasmata; nur 6% bleiben ungepaart. Lagebeziehungen deuten an, daß ein Teil dieser Univalente aus frühzeitig aufgelösten Bindungen hervorgegangen ist. Wenn in einer PMZ mehr als 2 akzessorische Chromosomen vorhanden sind, kann es trotz der geringen Größe dieser Elemente auch zur Bildung von Multivalenten, Trivalenten und Quadrivalenten kommen (Abb. 5c, d), nach Stichproben in etwa 0—50% (durchschnittlich 15% der PMZ). Diese Schwankungen erklären sich wahrscheinlich aus  $\pm$  idiotypisch gesteuerten individuellen Verschiedenheiten der Chiasma-Frequenz; so bildet etwa 72—128 (4 akzessorische Chromosomen) niemals Multivalente, wogegen sie bei 72—131 (1 akzessorischen Chromosom, aber prämeiotisch oft vermehrt) relativ häufig sind.

Während die Verteilung der akzessorischen Chromosomen in der Meiose bei Individuen mit zwei, meist gepaarten akzessorischen Chromosomen weitgehend normal ist, ergeben sich bei Individuen mit einer ungeraden bzw. erhöhten Zahl von akzessorischen Chromosomen teilweise Unregelmäßigkeiten. Die resultierenden Univalente teilen sich, wenn auch verzögert, meist schon in A I, aber nicht nochmals in A II; so bleiben sie vielfach als „laggards“ zwischen den frühen Telophasekernen liegen. Während der späten T II erfolgt dann aber doch vielfach noch eine nachträgliche Verschmelzung der Restkörper mit den Kernen (Abb. 5i). So ergeben sich etwa bei 72—114 (1 akzessorisches Chromosom) in A I bloß 2,5% Restkörper, in A II bis frühe T II 65%, in später T II dagegen nur mehr 20% Restkörper (200 PMZ). Entsprechend sind die Verhältnisse bei Individuen mit 3 akzessorischen Chromosomen; hier ist der Gegensatz im Verhalten der gepaarten und ungepaarten akzessorischen Chromosomen besonders deutlich erkennbar (Abb. 5e—h). Die Elimination von akzessorischen Chromosomen in bzw. nach der Pollenmeiose als Mikro-Nuclei (Abb. 5i, k) ist demnach nur von mäßiger Bedeutung (vgl. dazu auch die genetischen Daten, S. 541). Weiterhin muß mit gewissen Unregelmäßigkeiten der Verteilung der akzessorischen Chromosomen aus Multivalenten und — in sehr geringem Ausmaß — aus Non-Disjunction in A I gerechnet werden, wofür Hinweise aus der Analyse von M II und A II der Pollenmeiose vorliegen. Ähnlich dürften die Verhältnisse bei Univalenten in der EMZ-Meiose liegen (vgl. S. 542).

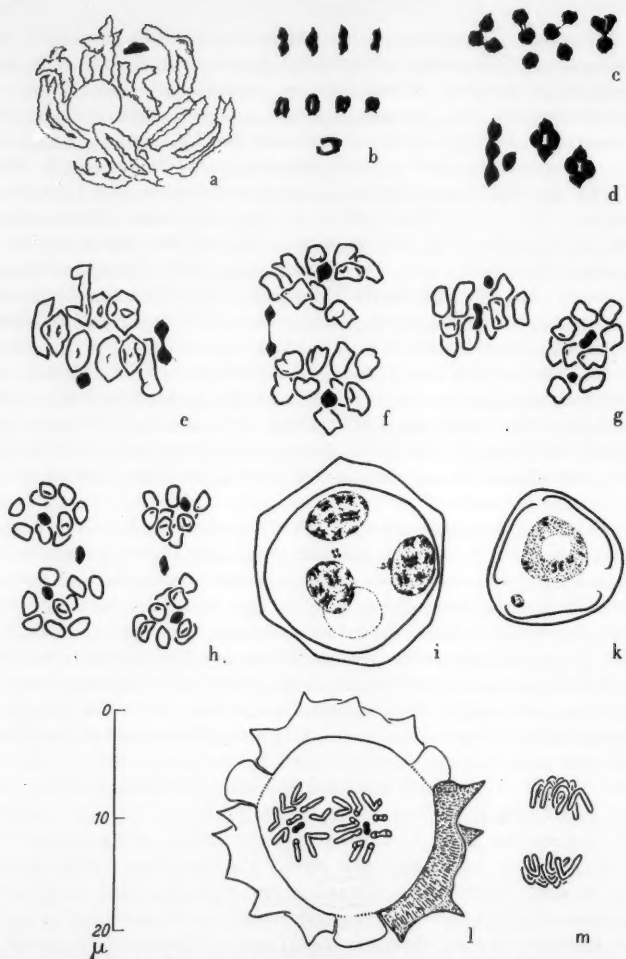


Abb. 5a—m. Akzessorische Chromosomen von *A. asplenifolia* in Pollenmeiose und Pollenmitose: a) Diakinese, akzessorisches Chromosom Univalent, b) akzessorische Chromosomen Univalente ohne (obere Reihe) und mit (untere Reihe) Schenkelpaarung ( $a \times s\text{-F}_1$ ; 72—114 c), d) akzessorische Chromosomen-Multivalente (III, IV; in fester und lockerer Bindung) und -Univalente in Diakinese bzw. MI ( $a \times s\text{-F}_1$ ; 96—13, 96—11); e—h Ablauf der Pollenmeiose bei einer Pflanze mit 3 akzessorischen Chromosomen ( $a \times s\text{-F}_1$ ; 96—13); MI I—A I—MI II—A II; i) verspäteter Einschluss bzw. Ausschluss von akzessorischen Chromosomen Univalenthäften in später T II, k) junges Pollenkorn mit Mikronucleus aus der ausgeschlossenen akzessorischen Chromosomen Univalenthälfte ( $a \times s\text{-F}_1$ ; 72—114); l, m) erste Pollenmitose, l) normale Teilung des akzessorischen Chromosoms, m) A-Gruppen in Seitenansicht, akzessorische Chromosomen-Spalthäufchen zwischen den Normalchromosomen nicht sichtbar ( $a \times s\text{-F}_1$ ; 72—150)

## 4. Verhalten im Gametophyt und Vererbung

Lassen sich bei *Achillea* im Zuge der Weitergabe der akzessorischen Chromosomen über den haploiden Gametophyten bis zur Befruchtung cytogenetische Sondermechanismen, vor allem Akkumulationsmechanismen erkennen? Für die erste Pollenmitose ist diese Frage auf Grund der cytologischen Untersuchungen negativ zu beantworten, die Verhältnisse sind hier als durchaus normal zu bezeichnen; Abb. 51 und m belegen den Ablauf der ersten Pollenmitose, wo in der kritischen Anaphase an den akzessorischen Chromosomen kein Non-Disjunction-Mechanismus in Erscheinung tritt. Die genetischen Befunde, besonders an  $f_2$ -Nachkommenschaften, die nach freiem Abblühen einer isolierten  $F_1$ -Population entstanden (vgl. S. 525 und besonders EHRENDORFER 1960b, Tabelle 3) bestätigen diese Tatsache für den ♂ Gametophyt

Tabelle 3. Akzessorische Chromosomen in Spermakernen der Pollenkörner von  $a \times s-F_1$ . Mischwerte aus verschiedenen Individuen.

f <sub>a</sub>  n	F <sub>1</sub> -Mutterpflanzen	F <sub>1</sub> -Vaterpflanzen					
		Spermakerne					M
		0	1	2	3	4	
		akzessorische Chromosomen					
23	64—12, 72—118 Eikerne: 0 akzessorische Chromosomen. . . . .	7	13	2	—	1	0,91
63	72—137, —139, —143, —149 Eikerne: 1 akzessorisches Chromosom . . . . .	12	36	14	—	1	1,08
86		19 22%	49 57%	16 19%	—	2 2%	1,03

und zeigen weiter, daß auch im ♀ Gametophyt keine Akkumulation der akzessorischen Chromosomen erfolgt.

So sind etwa aus der Zahl der akzessorischen Chromosomen bei diploiden  $f_2$ -Nachkommen aus  $F_1$ -Mutterpflanzen *ohne* und bei solchen mit konstant *einem* akzessorischen Chromosom in den Eikernen Rückschlüsse auf die Zahl der akzessorischen Chromosomen in den Pollenkörnern bzw. Spermakernen der diploiden  $F_1$ -Vaterpflanzen der Serien 64 + 72 möglich.

Bei 100% gerichteter Non-Disjunction in der ersten Pollenmitose dürften *nur* die Zahlen 0, 2, 4, . . . akzessorische Chromosomen auftreten; statt dessen dominiert die Zahl 1. Die Frequenz der Zahl 2 (19%) ist nach Berücksichtigung des somatischen Mittelwertes für die  $F_1$ -Population (2,16) und aus der cytologischen Tatsache, daß bei etwa  $\frac{1}{3}$  dieser  $F_1$ -Pflanzen die Produktion von Gameten mit 2 akzessorischen Chromosomen belegt ist, auch ohne Annahme eines Non-Disjunction-Mechanismus

mus verständlich. Das Auftreten der hohen Zahl von 4 akzessorischen Chromosomen (2%) läßt eine geringfügige Rate von gerichteter Non-Disjunction in der ersten Pollenmitose aber immerhin als möglich erscheinen.

Hinsichtlich der Verhältnisse im ♀ Gametophyt sind die Ergebnisse des  $f_2$ -Testes aufschlußreicher, da die Zahlen von akzessorischen Chromosomen in den Eikernen aus den Nachkommenschaften mit pentaploiden Vätern (ohne akzessorische Chromosomen) (vgl. S. 537 und EHRENDORFER 1960 b, Tabelle 3) direkt bzw. bei Funktion unreduzierter Eikerne nach Halbierung abgelesen werden können, wobei allerdings die instabilen Gruppen mit 1 bzw. mit 4 und mehr akzessorischen Chromosomen besser unberücksichtigt bleiben. Aus 30  $f_2$ -Individuen ergeben sich demnach für die Serien mit 2 bzw. 3 akzessorischen Chromosomen folgende Resultate:

Tabelle 4. Akzessorische Chromosomen in Eikernen von  $a \times s$ - $F_1$ -Individuen mit 2 bzw. 3 akzessorischen Chromosomen

Daten aus  $f_2$ -Nachkommenschaften mit pentaploiden Vätern (ohne akzessorische Chromosomen).

f <sub>2</sub> n	F <sub>1</sub> -Mutterpflanzen	Eikerne				M
		0	1	2	3	
		akzessorische Chromosomen				
21	11, 122, 137, 139, 143 somatisch 2 akzessorische Chromosomen . . . . .	—	21	—	—	1,0
9	120, 145 somatisch 3 akzessorische Chromosomen . . . . .	—	6	4	—	1,4

Hier anzufügen wären Stichproben aus einer  $F_1$ -Kreuzung, 72—138  $\times$  72—145 (beide mit 3 akzessorischen Chromosomen):

akzessorischen Chromosomen (2n): 0    1    2    3    4  
 $F_2$ -Individuen                    —    3    1    1    —    (M=1,6)

Aus allen oben angeführten Daten, besonders aus der Seltenheit von Eizellen mit einer erhöhten geraden Zahl von akzessorischen Chromosomen (etwa 2) muß gefolgert werden, daß bei *Achillea* auch auf der weiblichen Seite des Gametophyten ein gerichteter Non-Disjunction-Mechanismus nicht vorliegt. Weiter zeigt das Dominieren der zu erwartenden Zahlen von akzessorischen Chromosomen in den Eizellen, daß die meiotische Elimination von nachhinkenden akzessorischen Chromosomen keine, bei Individuen mit 3 akzessorischen Chromosomen nur eine untergeordnete Rolle spielt. Vor allem kann damit auch ein bevorzugter Einschluß von akzessorischen Chromosomen-Univalenten in

die präsumptive ES-Makrospore während der Meiose ausgeschlossen werden. (*Achillea* folgt dem Normaltyp der ES-Entstehung: HARLING 1950.) Das vorliegende Zahlenmaterial von  $f_2$ -Nachkommenschaften aus div.  $F_1$  mit akzessorischen Chromosomen (vgl. dazu auch Tabelle 3, EHRENDORFER 1960 b) läßt auch das Vorliegen von Sondermechanismen bei der Befruchtung (z. B. bevorzugtes Wachstum oder bevorzugte Befruchtungschancen von Pollenschläuchen oder Eizellen mit bestimmten Zahlen von akzessorischen Chromosomen) als unwahrscheinlich erscheinen.

### E. Diskussion

#### 1. Struktur und Entstehung akzessorischer Chromosomen

Die akzessorischen Chromosomen von *Achillea* fügen sich im Hinblick auf Struktur und Meioseverhalten gut in das allgemeine Bild dieser Sonderklasse von Chromosomen: Ebenso wie in der Mehrzahl der bisher beschriebenen Fälle sind sie heterobrachial (also keine Isochromosomen und nicht telocentrisch!) sowie stark heterochromatisch; im Formwechsel sind gegenüber den viel weniger heterochromatischen Normalchromosomen keine Abweichungen gegeben. Die akzessorischen Chromosomen von *Achillea* sind kleiner als die Normalchromosomen und paaren sich mit diesen nicht, untereinander aber ohne weiteres, wobei trotz ihrer geringen Größe auch Multivalente entstehen können. Gegenüber den akzessorischen Chromosomen bei anderen Compositen-Gattungen ergeben sich damit teils Übereinstimmungen (etwa *Crepis syriaca*: CAMERON 1934, *C. conyzaeifolia*: FRÖST und ÖSTERGREN 1959, *Xanthisma texanum*: WITKUS et al. 1955, BERGER et al. 1956), teils Unterschiede: So paaren sich etwa die akzessorischen Chromosomen von *Centaurea scabiosa* in der Meiose nicht (FRÖST 1956, 1957), bei *Parthenium* kommt es zu früher Auflösung der Paarung und extremer Allozyklie (CATCHESIDE 1950 b).

Für die Entstehung von akzessorischen Chromosomen ist bei vielen Tieren, aber auch Lebermoosen (LORBEER 1941) eine Herkunft aus Geschlechtschromosomen belegt worden. Aus Normalchromosomen können akzessorische Chromosomen durch Fehlteilung des Centromers (vgl. dazu etwa VAARAMA 1950, 1953, SEARS 1952 a, REESE 1954, BROWN 1958) oder durch „Heterochromatinisierung“ (FERNANDES 1949 a) hervorgehen. Normalerweise aber erfahren Normalchromosomen im Zuge von spontanen Chromosomenaberrationen strukturelle Umbauten und treten dann als überzählige akzessorische Chromosomen zum Standard-Karyogramm hinzu. Beispiele für das parallele Auftreten von spontanen Chromosomenaberrationen, überzähligen Chromosomen und akzessorischen Chromosomen finden sich vielfach, so etwa bei den Gattungen *Matthiola*, *Clarkia* (einschl. *Godetia*), *Oenothera*, *Lycopersicum*, *Crepis*, *Fritillaria*, *Trillium*, *Paris*, *Scilla*, *Allium*, *Narcissus*, *Tradescantia*, *Zea*,

*Secale* und bei einigen Tiergruppen, z. B. Heuschrecken. Speziell hingewiesen sei auf den Zusammenhang zwischen chromosomalem Polymorphismus und Vorkommen von akzessorischen Chromosomen in Populationen von *Clarkia* (H. LEWIS 1951), ferner auf die Daten bezüglich der Entstehung von akzessorischen Chromosomen bei FROST (1927), LESLEY und LESLEY (1929), WHITACKER (1936) sowie EMSWELLER und JONES (1938). Eine entsprechende experimentelle Herstellung von akzessorischen Chromosomen nach Röntgenbestrahlung ist WÖHRMANN (1955) gelungen.

Bei *Achillea* sind mit der parallelen Häufung von Individuen mit erhöhter spontaner Chromosomenaberrationsrate und solchen mit akzessorischen Chromosomen auf der Diploidstufe und ihrem Seltenerwerden bzw. Fehlen auf den höheren Polyploidstufen (EHRENDORFER 1959d) besonders klare Hinweise auf den kausalen Zusammenhang zwischen diesen beiden Phänomenen gegeben. Überzählige Normalchromosomen als Ausgangsmaterial für die Entstehung von akzessorischen Chromosomen finden sich bei *Achillea* infolge mangelhafter Synthese und unregelmäßiger Verteilung der ungepaarten Homologen in der Meiose der Diploiden recht häufig (Beispiele bei *A. setacea*, *A. asplenifolia* und ihren Hybriden, EHRENDORFER 1959b). Gameten mit überzähligen Normalchromosomen werden bei aberrationslabilen Individuen von *Achillea* auch infolge von prämeiotischer Non-Disjunction gebildet (EHRENDORFER 1959b). Weitere Etappen in der Genese von akzessorischen Chromosomen sind bei *A. crithmifolia* belegt (S. 526): strukturelle Umbauten → heteromorphe Bivalentchromosomen mit verminderter Paarungsaffinität → überzähliges Auftreten solcher Elemente, Verlust der Paarungsaffinität.

Im einzelnen zeigt die Analyse des Feinbaus der schon stärker abgeleiteten akzessorischen Chromosomen von *A. asplenifolia*, daß ihre Entstehung nicht durch einfache strukturelle Umbauten aus Normalchromosomen erfolgt sein kann. Das entspricht den Befunden bei *Zea*, *Secale*, *Festuca* und *Sorghum* (REDDY 1958). Die Möglichkeiten für eine derartige Entstehung von akzessorischen Chromosomen über Zwischenstadien, ähnlich den für *A. crithmifolia* geschilderten, sind mannigfaltig: terminale Stückverluste infolge Fragmentationen, Inversionen und Brückenbildungen, Reunionen zwischen Schwesterchromatiden oder zwischen Chromatiden gepaarter Homologer, Translokationen und vor allem Fehlpaarungen zwischen den Armen eines Chromosoms mit nachfolgendem „falschem“ Crossing-over und Deletionen. Alle diese Aberrationstypen wurden bei diploiden Achilleen, z. T. auch an überzähligen Chromosomen festgestellt (EHRENDORFER 1959b).

Ist einmal die Paarung zwischen akzessorischen und normalen Chromosomen unterbunden, so erfolgt bald eine Sonderentwicklung der

ersteren (DARLINGTON 1956). Dieser Umstand wird dadurch begünstigt, daß die akzessorischen Chromosomen meist nicht lebensnotwendig sind und wegen ihres hohen Gehalts an Heterochromatin eine erhöhte Tendenz zu Fehlpaarungen der Schenkel (vgl. S. 538—539; weitere Hinweise bei McCLINTOCK 1933, FERNANDES 1946, BOSEMARK 1954a, 1956b, 1957b, LONGLEY 1956) sowie erhöhte Bruchlabilität aufweisen. Weiter machen akzessorische Chromosomen infolge ihres häufigen Auftretens als Univalente öfter Fehlteilungen am Centromer durch (MÜNTZING 1944, ÖSTERGREN 1947b, MÜNTZING und LIMA-DE-FARIA 1949, 1953, BOSEMARK 1956b, 1956c, KAYANO 1956a, FRÖST 1956). Diese Umstände bedingen gegenüber den Normalchromosomen verstärkte strukturelle Umbauten der akzessorischen Chromosomen. Beweise dafür sind die Derivate der akzessorischen Chromosomen bei *Achillea* (S. 529) ebenso wie bei vielen anderen Gattungen (CAMERON 1934, DARLINGTON und THOMAS 1941, DARLINGTON und UPCOTT 1941a, RANDOLPH 1941b, MÜNTZING 1948c, 1949b, 1955, HÅKANSSON 1950, CLELAND 1951, MÜNTZING und LIMA-DE-FARIA 1952, BOSEMARK 1954a, 1956b, LIMA-DE-FARIA 1955, GRUN 1959).

## 2. Direkte Selbstregulierung der Zahl akzessorischer Chromosomen

Gegenüber dem Teilungsmodus und der Vererbung der Normalchromosomen bestehen bei den akzessorischen Chromosomen vielfach besondere cytogenetische Regulationsmechanismen, welche ihre Zahl intra-individuell bzw. im Erbgang direkt beeinflussen, und zwar teils im negativen, teils im positiven Sinne. Dabei lassen sich verschiedene Phasen unterscheiden.

a) *Somatischer Bereich*. Bei *Achillea* nimmt die somatische Reduktion der Zahl der akzessorischen Chromosomen mit steigender Primärzahl zu, wobei allerdings die Zahl 2 einen relativ stabilen Optimalwert darstellt. Entsprechende Einzelhinweise finden sich für die akzessorischen Chromosomen von *Agrostis canina* (BJÖRKMANN 1951), *Caltha* (REESE 1954), *Poa alpina* (NYGREN 1955b), *Crepis conyzaeifolia* (FRÖST und ÖSTERGREN 1959) und besonders *Poa trivialis* (BOSEMARK 1957b) sowie *Allium* (GRUN 1959, TSCHERMAK-WOESS und SCHIEMANN 1960). Einen anderen Typ somatischer Reduktion repräsentieren die Formen, bei denen die akzessorischen Chromosomen allgemein in den Wurzeln oder überhaupt außerhalb der Keimbahn eliminiert werden (*Sorghum purpureo-sericeum*, *Panicum coloratum*, *Poa alpina*, *P. timoleontis*, *Xanthisma texanum* und *Polycelis*; MÜNTZING 1959). Eine gewisse allgemeine intra-individuelle Instabilität der Zahl der akzessorischen Chromosomen wurde verschiedentlich, besonders auch bei Hybriden (HÅKANSSON 1950, CLELAND 1951, RUTISHAUSER 1956a) belegt.



b) *Archepor*, prämeiotische Mitosen. Bei *Achillea* ist eine auffällige Anreicherung von akzessorischen Chromosomen im ♂ und besonders im ♀ *Archepor*, allerdings fast ausschließlich bei Individuen mit der Primärzahl von 1 akzessorischen Chromosom festzustellen. Damit liegt ein noch nicht beschriebener Akkumulationsmechanismus von akzessorischen Chromosomen vor. Gewisse Parallelen sind etwa in der verstärkten prämeiotischen Instabilität der akzessorischen Chromosomen bei *Polycelis* (MELANDER 1950), *Phleum phleoides* (BÖCHER 1950), *Caltha* (REESE 1954), *Secale* (LIMA-DE-FARIA 1955) und bei *Allium cernuum* (GRUN 1959) zu erblicken. Vielleicht entspricht auch der (noch nicht aufgeklärte) Akkumulationsprozeß bei *Crepis syriaca* (CAMERON 1934) dieser Phase bei *Achillea*.

c) *Meiose*. Die vielfach festgestellte  $\pm$  intensive meiotische Elimination von univalenten akzessorischen Chromosomen, besonders auch von Isochromosomen (MÜNTZING 1945 b, 1949 b, 1951 b, 1955, MÜNTZING und LIMA-DE-FARIA 1953) spielt bei *Achillea* nur eine geringe Rolle. Obwohl sich die akzessorischen Chromosomen-Univalente meist schon in A I teilen, werden sie, ohne in A II eine weitere Teilung zu erfahren, gewöhnlich doch noch verspätet in die T II-Gruppen miteingeschlossen. Entsprechende Angaben liegen auch für *Trillium* (SPARROW, POND und SPARROW 1952), *Festuca* (BOSEMARK 1954 a, b), *Centaurea* (FRÖST 1956, 1957), weitere Gramineen (BOSEMARK 1957 b) und *Allium cernuum* (GRUN 1959) vor. Starke Unregelmäßigkeiten ergeben sich nach meiotischer Non-Disjunction (BÖCHER et al. 1955, KAYANO 1956 b, BLACKWOOD 1956) und infolge polarisierter Verteilung aufgelöster akzessorischer Chromosomen-Bivalente in A I bei *Parthenium* (CATCHESIDE 1950 b). — Ausgesprochene Vermehrungsmechanismen der akzessorischen Chromosomen in der Meiose sind Doppelteilung in A I und II (vereinzelte bei *Sorghum*, DARLINGTON und THOMAS 1941 und bei *Zea*, hier allerdings nur bei Individuen mit wenigen akzessorischen Chromosomen, BLACKWOOD 1956) und bevorzugter Einschluß von univalenten akzessorischen Chromosomen, in die zum Embryosack werdende Makrospore (*Lilium*: KAYANO 1956 b, 1957, *Trillium*: RUTISHAUSER 1956 a und *Plantago serraria*: FRÖST 1959). — Weder besondere Unregelmäßigkeiten noch Vermehrungsmechanismen während der Meiose konnten bisher für *Achillea* belegt werden.

d) *Pollen- und ES-Mitosen*. Besonders genau wurde die gerichtete Non-Disjunction von akzessorischen Chromosomen in der ersten Pollenmitose bei vielen Gramineen untersucht (BOSEMARK 1956 b, 1957 b und die dort angeführte Literatur). Dieser Prozeß führt zu einer Anreicherung von akzessorischen Chromosomen im generativen Kern auf Kosten des vegetativen Kerns. Eine entsprechend gerichtete Non-Disjunction bei der ersten ES-Mitose ist bisher nur für *Secale* beschrieben worden

(HÅKANSSON 1948a). Non-Disjunction in der zweiten Pollenmitose (*Zea*: ROMAN 1948, BLACKWOOD 1956) führt erst in Kombination mit Spezialprozessen bei der Befruchtung zur Akkumulation von akzessorischen Chromosomen. — Bei *Achillea* ist mit gerichteter Non-Disjunction nur ganz vereinzelt in der ersten Pollenmitose (und im ES ??) zu rechnen.

e) *Befruchtung*. Für *Zea* wurde bevorzugte Befruchtung von Eizellen durch Spermakerne mit höheren Zahlen von akzessorischen Chromosomen belegt (ROMAN 1948, BLACKWOOD 1956, CATCHESIDE 1956).

Das spezifische Verhalten akzessorischer Chromosomen in den Phasen a—e scheint primär besonders durch eine gegenüber den Standardchromosomen abweichende Reduplikationsrate (beschleunigt: Doppelteilung c, verzögert: Non-Disjunction a, b, d) bedingt zu sein. Non-Disjunction bzw. „lagging“ von Univalenten gekoppelt mit asymmetrischen Zellteilungen führt weiter zu gerichteter Akkumulation in bestimmten Zellen (a, b, c, d) und über spezifische Beeinflussung der Zellphysiologie und Zellkonkurrenz allenfalls zur bevorzugten Vermehrung (e) bzw. Eliminierung (a) solcher Trägerzellen. Die Non-Disjunction-Prozesse in bestimmtem Zellmilieu werden — soweit bisher bekannt — durch bestimmte heterochromatische Chromosomensegmente ausgelöst. Diese Tatsache steht im Gegensatz zu der ursprünglichen Auffassung vom „schwachen“ Centromer der akzessorischen Chromosomen (DARLINGTON und THOMAS 1941, DARLINGTON und UPCOTT 1941a, ROMAN 1947, DARLINGTON 1956). Die Non-Disjunction-These stützt sich vor allem auf cytologische Beobachtungen, besonders der Pollenmitose (MÜNTZING 1946a, ÖSTERGREN 1947, BOSEMARK 1956b, 1957b), auf die Festlegung der tatsächlichen Non-Disjunction-Segmente<sup>1</sup> durch Analyse translozierter bzw. defizienter akzessorischer Chromosomen (MÜNTZING 1945b, ROMAN 1950, MÜNTZING und LIMA-DE-FARIA 1952, MÜNTZING und NYGREN 1955, BOSEMARK 1956b, c) und auf Strukturanalysen am Centromer (MÜNTZING und LIMA-DE-FARIA 1949, LIMA-DE-FARIA 1955, REDDY 1958). Weiter ergeben sich aus dem gehäufteten Auftreten von geraden Zahlen der akzessorischen Chromosomen bei intra-individueller Aneuploidie Hinweise auf somatische Non-Disjunction (MÜNTZING 1948c, 1949 bei *Poa alpina*, MELANDER 1950 bei *Polycelis*). Bei *Achillea* sprechen das letztere Argument, das Fehlen von Mikronuclei, das normale Aussehen und Verhalten der Centromeren der akzessorischen Chromosomen und die Tatsache, daß intra-individuelle Instabilität nur bei bestimmten Primärzahlen von sonst identischen akzessorischen Chromosomen in Erscheinung tritt, ebenfalls für die Non-Disjunction-These.

Es ist bemerkenswert, daß somatische Non-Disjunction bei akzessorischen Chromosomen von *Secale* durch Kälte ausgelöst werden kann

<sup>1</sup> Dabei besteht teilweise räumliche Trennung zwischen Steuersegment und tatsächlichem Kontaktpunkt!

(DARLINGTON 1947); ähnlich kann Non-Disjunction vor allem in heterochromatischen Segmenten auch bei Normalchromosomen experimentell hervorgerufen werden (DARLINGTON und LA COUR 1940, SHAW 1958). Weiter bestehen zwischen Non-Disjunction und Chromosomen-Aberrationen ganz allgemein enge Zusammenhänge, wobei etwa aberrationslabile Individuen von *Achillea* — analog den Verhältnissen bei akzessorischen Chromosomen, Phase b — intra-individuelle Aneuploidie und prämeiotische Anreicherung von Normalchromosomen zugunsten der PMZ aufweisen können (EHRENDORFER 1959b). Diese Zusammenhänge legen die Annahme nahe, daß spontanen Chromosomenaberrationen, Non-Disjunction und intra-individueller Zahlenlabilität zumindest teilweise gemeinsame Ursachen zugrunde liegen. Als Arbeitshypothese sei angenommen, daß es sich hierbei um Defekte in der Chromatinproduktion handelt. In Abhängigkeit von der jeweiligen idiotypischen Konstitution treten diese Defekte offenbar an bestimmten „Engpässen“ in der individuellen Entwicklung (etwa in den prämeiotischen Mitosen) und hier wiederum an bestimmten Chromosomen (etwa den akzessorischen Chromosomen) und an bestimmten Chromosomenabschnitten (etwa heterochromatischen Segmenten) verstärkt in Erscheinung.

Unter diesem Gesichtspunkt wird auch verständlich, daß bei verschiedenen Biotypen erbliche Unterschiede in der Intensität der Non-Disjunction bestehen (*Drosophila*, Geschlechtschromosomen: GOWEN 1928, SWANSON 1957, S. 91—93; *Gramineae*, somatische Instabilität der akzessorischen Chromosomen: BLACKWOOD 1956, BOSEMARK 1956c; 1. und 2. Pollenmitose: BOSEMARK 1954b, BLACKWOOD 1956).

Durch verschiedene Zahlen von chromosomalen Zusatzelementen kann das Gleichgewicht der Chromosomenreproduktion Veränderungen erfahren. Dementsprechend ist auch die Non-Disjunction infolge ausgeprägter gegenseitiger Beeinflussung stark von der Zahl der jeweils vorhandenen akzessorischen Chromosomen abhängig, nicht nur bei *Achillea*, sondern auch bei *Festuca pratensis*: So wird die verlorengegangene Fähigkeit zur Non-Disjunction bei einem akzessorischen Chromosomenfragment durch Anwesenheit von vollständigen akzessorischen Chromosomen wiederhergestellt; weiter ist die pollenmitotische Non-Disjunction-Rate hier bei zwei akzessorischen Chromosomen wesentlich stärker als bei einem, sinkt aber bei höheren Zahlen von akzessorischen Chromosomen wieder ab (BOSEMARK 1954b, 1956b).

Auf diese Voraussetzungen gestützt, kann die Arbeitshypothese über das Verhalten der akzessorischen Chromosomen bei den vorliegenden *Achillea*-Hybriden erweitert werden: Eine normale Reproduktion der Chromosomen scheint hier im wesentlichen an ein Eu/Heterochromatins-Gleichgewicht gebunden zu sein, wie es durch Hinzutreten von 2 akzessorischen Chromosomen zu den Normalchromosomen gegeben ist. Unter

diesen Bedingungen ist auch die Reproduktion der akzessorischen Chromosomen normal, sie sind intra-individuell weitgehend stabil. Sind mehr als 2 akzessorische Chromosomen vorhanden (Heterochromatin-Überschuß!), so treten mit zunehmend gestörtem Gleichgewicht immer stärkere Reproduktionsstörungen bei den labilen akzessorischen Chromosomen auf; Non-Disjunction und Zellkonkurrenz führen schon im somatischen Bereich zu Reduktion und Rückregulierung der Zahl der akzessorischen Chromosomen (Phase a). Ist dagegen primär nur 1 akzessorisches Chromosom vorhanden (Heterochromatin-Defizit!), so kommt es erst in den prämeiotischen Mitosen im Archespor zu Non-Disjunction und im Zuge von polarisierter Verteilung zur Anreicherung von akzessorischen Chromosomen im PMZ bzw. EMZ (Phase b). Durch die Annahme einer derartigen cytogenetisch differenzierten Verhaltensweise der akzessorischen Chromosomen ließe sich die auffällige Selbststeuerung der Zahl von akzessorischen Chromosomen bei *Achillea* zwanglos erklären.

Zu den oben besprochenen *direkten* Regulationsfaktoren der Zahl der akzessorischen Chromosomen treten die *indirekten*, welche durch Auswirkungen der akzessorischen Chromosomen auf die Konkurrenzkraft ihrer Träger wirksam werden (EHRENDORFER 1960b). Durch das Zusammenwirken direkter und indirekter Regulationsfaktoren ergibt sich das für die meisten Populationen mit akzessorischen Chromosomen so charakteristische Bild eines balancierten Zahlen-Polymorphismus; das soll an Hand der experimentellen Populationen von *Achillea*-Hybriden in der folgenden Arbeit (EHRENDORFER 1960b) noch eingehender dargestellt werden.

### Summary

1. In the polyploid-complex *Achillea millefolium* L. (sens. lat.) diverse types of accessory chromosomes have been found in populations of the micro-species *A. asplenifolia* Vent., *A. roseo-alba* Ehrendf., *A. crithmifolia* W. K. (all 2x) and *A. collina* Beck. (4x) (Fig. 1). Cytological analyses of 186 individuals demonstrate that accessories are concentrated on the diploid level (16,3%), rare on the tetraploid (1,2%) and absent on hexa- and octoploid levels. Occurrence and frequency of accessories and spontaneous chromosome aberrations are correlated on the different ploidy levels.

2. Various steps in the origin of accessory chromosomes have been found in diploid *Achillea* species: Diverse types of spontaneous chromosome aberrations (including deletions) → heteromorphous bivalents → standard chromosomes and transformed chromosomes as supernumeraries → typical accessory chromosomes, strongly differentiated structurally and without pairing affinity to standard chromosomes (Fig. 1a—c). This problem is further elaborated in the discussion (p. 543).

3. Prophase analyses show that accessory chromosomes of *A. asplenifolia* are about  $\frac{1}{3}$  the average size of standard chromosomes and have a normal, submedian centromere; they are relatively more heterochromatic than standard chromosomes but have euchromatic segments too (Fig. 2, 3); they differ from standard chromosomes in a number of structural changes. Some derived unstable fragment accessories have been observed (Fig. 4).

4. Cytological observations on 325 individuals of *A. asplenifolia* hybrids and hybrid progenies indicate that the behaviour of accessories during mitosis and meiosis is in some respects different from standard chromosomes.

5. In somatic tissues of individuals with increasing primary numbers of accessories (up to 6) there is a growing tendency for intra-individual numerical reduction; only individuals with 2 accessories are relatively stable (Table 1, 2). This reduction is probably due to non-disjunction of accessories and cell competition. The number of standard chromosomes is practically always stable.

6. In premeiotic mitoses in the ♂ and especially the ♀ archespor of individuals with the low primary number of 1 accessory chromosome there is a sometimes strong tendency for accumulation of accessories in favour of future PMC's and EMC's (Table 2); this is probably due to non-disjunction and polarized distribution.

7. Meiotic pairing and distribution of accessories are quite regular; multivalents are easily formed. Univalents show frequent non-homologous inter-arm-pairing. Accessories never pair with standard chromosomes. Elimination of accessories, even as univalents, is quite low during meiosis (Fig. 5).

8. In pollen- and ES-mitoses accessories behave normally, non-disjunction is absent (or very rare). There are no indications for special accumulation mechanisms of accessories during fertilization.

9. In *Achillea* the individual dosage of accessories is responsible for their differential cytological behaviour in somatic tissues and the archespor; this in turn is responsible for their direct numerical self-regulation within the population: Increase from low primary numbers, decrease from high primary numbers.

10. Normal division versus non-disjunction of accessories may be conditioned by individual euchromatin/heterochromatin balance and its influence on the reduplication of specific heterochromatic segments on the accessories (discussion p. 548—549).

## Literatur

(Um das Literaturverzeichnis möglichst raumsparend zu gestalten, wurde auf die Aufnahme derjenigen im Text genannten Arbeiten verzichtet, die schon bei TISCHLER (1942—1951 und 1953—1957) angeführt sind; im folgenden fehlende Zitate mögen in den genannten Bänden dieses Handbuches nachgesehen werden.)

- BERGER, C. A., E. J. FEELEY and E. R. WITKUS: The cytology of *Xanthisma texanum* DC. IV. Macrosporogenesis and embryosack formation, pollen mitosis and embryo formation. Bull. Torrey bot. Club. **83**, 428—434 (1956).
- BLACKWOOD, M.: The inheritance of B-chromosomes in *Zea mays*. Hereditas **10**, 353—366 (1956).
- BOSEMARK, N. O.: On accessory chromosomes in *Festuca pratensis*. IV. Cytology and inheritance of small and large accessory chromosomes. Hereditas (Lund) **42**, 235—250 (1956b). — Cytogenetics of accessory chromosomes in *Phleum phleoides*. Hereditas (Lund) **42**, 443—466 (1956c). — Further studies on accessory chromosomes in grasses. Hereditas (Lund) **43**, 236—297 (1957b).
- BROWN, M. S.: The division of univalent chromosomes in *Gossypium*. Amer. J. Bot. **45**, 24—32 (1958).
- CATCHESIDE, D. G.: The genetics of B-chromosomes in maize. Hereditas **10**, 345—351 (1956).
- DARLINGTON, C. D.: Chromosome botany. London: G. Allen & Unwin 1956.
- , and A. D. WYLIE: Chromosome atlas of flowering plants. London: G. Allen & Unwin 1955.
- EHRENDORFER, F.: Akzessorische Chromosomen, Kreuzungsfertilität und Polyploidie beim *Achillea millefolium*-Komplex (*Compositae*). Naturwissenschaften **44**, 405—406 (1957). — *Achillea roseo-alba* Ehrendf., spec. nov., eine hybridogene, di- und tetraploide Sippe des *Achillea millefolium*-Komplexes. Öst. bot. Z. **106**, 363—368 (1959a). — Spontane Chromosomenaberrationen und andere Meiosestörungen bei diploiden Sippen des *Achillea millefolium*-Komplexes. (Zur Phylogenie der Gattung *Achillea*, II.). Chromosoma (Berl.) **10**, 365—406 (1959b). — Unterschiedliche Störungssyndrome der Meiose bei diploiden und polyploiden Sippen des *Achillea millefolium*-Komplexes und ihre Bedeutung für die Mikro-Evolution. (Zur Phylogenie der Gattung *Achillea*, IV.) Chromosoma (Berl.) **10**, 482—496 (1959d). — Differentiation-hybridization cycles and polyploidy in *Achillea*. Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. **24**, 141—152 (1959e). — Akzessorische Chromosomen bei *Achillea*: Auswirkungen auf das Fortpflanzungssystem, Zahlen-Balance und Bedeutung für die Mikro-Evolution. (Zur Phylogenie der Gattung *Achillea*, VI.). Z. Vererb.-Lehre (1960b, im Druck).
- FRÜST, S.: The cytological behaviour of accessory chromosomes in *Centaurea scabiosa*. Hereditas (Lund) **42**, 415—431 (1956). — The inheritance of accessory chromosomes in *Centaurea scabiosa*. Hereditas (Lund) **43**, 403—422 (1957). — The cytological behaviour and mode of transmission of accessory chromosomes in *Plantago serraria*. Hereditas (Lund) **45**, 191—210.
- , and G. ÖSTERGREN: *Crepis pannonica* and *C. conyzaeifolia*—two more species with accessory chromosomes. Hereditas (Lund) **45**, 211—214 (1959).
- GOWEN, J. W.: On the mechanism of chromosome behaviour in male and female *Drosophila*. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **14**, 475—477 (1928).
- GRUN, P.: Variability of accessory chromosomes in native populations of *Allium cernuum*. Amer. J. Bot. **46**, 218—224 (1959).
- HARLINC, G.: Embryological studies in the *Compositae*. I. *Anthemideae*-*Anthemidinae*. Acta Horti berg. **15**, 135—168 (1950).

- KAYANO, H.: Cytogenetic studies in *Lilium callosum*. I. Three types of supernumerary chromosomes. II. Preferential segregation of a supernumerary chromosome. Mem. Fac. Sci., Kyushu Univ., Ser. E (Biol.) **2** (2), 45—52, 53—60 (1956a, b). — III. Preferential segregation of a supernumerary chromosome in EMCs. Proc. Jap. Acad. **33**, 553—558 (1957).
- MELANDER, Y.: Accessory chromosomes in animals, especially *Polycelis tenuis*. Hereditas (Lund) **36**, 19—38 (1950).
- MÜNTZING, A.: Accessory chromosomes. Trans. Bose Res. Inst. (Calcutta) **22**, 1—15 (1958). — A new category of chromosomes. Proc. X. Intern. Congr. Genet. **1**, 453—467 (1959).
- REDDY, V. R.: On the differentiation of A and B chromosomes of *Sorghum purpureo-sericeum* at pachytene. J. Ind. Bot. Soc. **37**, 279—289 (1958).
- RUTISHAUSER, A.: Genetics of fragment chromosomes in *Trillium grandiflorum*. Heredity **10**, 195—204 (1956a).
- SCHNEIDER, I.: Zytogenetische Untersuchungen an Sippen des Polyploid-Komplexes *Achillea millefolium* L. s. lat. (Zur Phylogenie der Gattung *Achillea*, I.) Öst. bot. Z. **105**, 111—158 (1958).
- SHAW, G. W.: Adhesion loci in the differentiated heterochromatin of *Trillium* species. Chromosoma (Berl.) **9**, 292—304 (1958).
- SWANSON, C. P.: Cytology and cytogenetics. Englewood Cliffs, N. J.: Prentice-Hall 1957.
- TISCHLER, G.: Allgemeine Pflanzenkaryologie. 2. Hälfte: Kernteilung und Kernverschmelzung, 2. Aufl. Handbuch der Pflanzenanatomie, Bd. II. Berlin: Gebrüder Bornträger 1942—1951. — Erg.-Bd.: Angewandte Pflanzenkaryologie, Liefg 1—5. Berlin: Gebrüder Bornträger 1953—1957.
- TSCHERMAK-WOESS, E., u. H. SCHIEMAN: Strukturelle Hybridität und akzessorische Chromosomen bei *Allium pulchellum*. Öst. bot. Z. **107**, 212—227 (1960).
- VAARAMA, A.: Accessory chromosomes in the moss *Dicranum majus*. Nature (Lond.) **165**, 185 (1950). — Chromosome fragmentation and accessory chromosomes in *Orthotrichum tenellum*. Hereditas (Lund) **39**, 305—316 (1953).
- WHITE, M. J. D.: Animal cytology and evolution, 2nd edit. New York: Cambridge University Press 1954.
- WITKUS, E. R., T. J. LOWERY and C. A. BERGER: The cytology of *Xanthisma texanum* DC. II. Additional chromosome types. Bull. Torrey bot. Club. **82**, 367—376 (1955).
- WÖHRMANN, K.: Keimungsphysiologische, Fertilitäts- und zytologische Untersuchungen an Nachkommenschaften röntgenbestrahlter Samen von *Alopecurus pratensis*. Z. Pflanzenzücht. **34**, 391—408 (1955).

Univ.-Doz. Dr. FRIEDRICH EHRENDORFER,  
Botanische Abteilung des Naturhistorischen Museums,  
Wien I, Burgring 7, Austria



From the Department of Pathology, University of Wisconsin, Madison, Wisconsin

## THE RELATION OF DNA SYNTHESIS AND MITOSIS IN TOBACCO PITH TISSUE CULTURED IN VITRO\*

By

KLAUS PATAU and NIRMAL K. DAS

With 8 Figures in the Text

(Received October 25, 1960)

### A. Introduction

In previous studies (DAS, PATAU and SKOOG 1956, 1958; PATAU, DAS and SKOOG 1957) the induction of DNA synthesis, mitosis, and cytokinesis in excised tobacco pith by kinetin and indole acetic acid (IAA) has been investigated. One result was that under culture conditions which brought about mitoses, DNA doubling took place in many nuclei before the onset of any mitotic activity in the tissue although the latter contained a majority of nuclei that had DNA contents (4 C or 8 C) sufficient for diploid or tetraploid mitoses. A similar timing has been reported for the beginning of DNA synthesis and of mitosis in regenerating livers (PRICE and LAIRD 1950, JARDETSKY *et al.* 1956). By the method used it was in both cases impossible to demonstrate that the first mitoses occurred in the same cells in which the nuclei had just undergone DNA synthesis, but this was, of course, what the timing suggested. In this context it appeared also relevant that according to NAYLOR (1958) all nuclei of the promeristem ("zone of inhibition") in axillary buds of *Tradescantia* have the DNA content 2 C which is only half the amount found in every normal diploid prophase. In this case cell reproduction obviously must start with DNA synthesis.

Do these observations indicate that nuclei after a prolonged stay in interphase must undergo DNA synthesis before they can enter mitosis? This question is not only part of the problem of growth initiation but is also related to that of somatic polyploidy. With these aspects in mind, the present analysis of the relation of mitosis and DNA synthesis was undertaken in a differentiated, partially polyploid, tissue resuming growth.

For this purpose pieces of tobacco pith cultured on a nutrient medium containing kinetin and IAA are a suitable material. In the presence of both these substances continuous cell reproduction is obtained in a tissue that lacks all mitotic activity *in situ*. With this material, the autoradiographic method can be used to identify reliably those nuclei which have

\* This work has been supported by research grants to K. PATAU from the U.S. Public Health Service (grant No. C-3313) and the American Cancer Society.

undergone DNA synthesis in culture (Das *et al.* 1958), and it is further possible to distinguish "new" cells, *i.e.* cells originated by a division in culture, from "old" cells all of which had evidently been formed before the large increase in cell size that characterizes the differentiation of pith tissue (Das *et al.* 1956). It is, therefore, feasible to determine for any given mitosis what, in terms of DNA doubling and mitosis, had happened to this particular cell since the beginning of culture. In addition, the polyploidy classes of mitotic nuclei can be determined and related to the DNA classes as revealed by DNA measurements of interphase nuclei in freshly excised pith tissue.

### B. Material and Methods

Randomly chosen blocks of pith tissue were cultured on agar containing WHITE's nutrient solution to which had been added 2 mg/l of IAA and 0.5 mg/l of kinetin in one experiment, henceforth called A, and 1 mg/l of kinetin in a second, more extensive, experiment, B. This difference in the kinetin concentration was probably of no consequence (*cf.* Das *et al.* 1956). In both experiments the medium was further supplemented with tritiated thymidine. The plant material, the excision of the tissue blocks, and details of the culture technique, of the preparation of slides (sections, 50  $\mu$  thick) and autoradiographs, and of the microspectrophotometric DNA (Feulgen) measurements (two-wavelengths method) have been described by Das *et al.* (1958). In Fig. 3 of that paper is shown the distribution of DNA values in 120 interphase nuclei at the beginning of culture in what is now called experiment B. These data, therefore, represent the initial state of the tissue in experiment B.

All new DNA measurements were made on mitoses for the sole purpose of ascertaining the polyploidy class which otherwise would have remained doubtful in a number of cases. Sections of tobacco pith fixed in acetic alcohol are not usable for chromosome counts and estimates of the degree of polyploidy are not sufficiently reliable (see below). Diploid, tetraploid, and octoploid mitoses (no higher classes were encountered in the present study) have DNA contents of 4C, 8C, and 16C respectively, if the ploidy classes are defined by the number of chromatids rather than that of chromosomes. This is justified as four-stranded chromosomes (diplochromosomes) are known to fall apart in the course of mitosis. It would have been of some interest to determine the number of chromatids per chromosome, but this could not be done reliably in the available slides. Suffice it to say that about a quarter of the polyploid metaphases seemed to contain diplochromosomes and that the three measured polyploid anaphases seemed to have normal chromosomes.

Proximity of mitoses to cell walls, which cause non-specific light losses ("absorption"), imposed appreciable errors upon the measurements as it was impractical to select mitoses for absence of strong cell wall interference. To reduce the effects of random reading errors, each mitosis was measured twice. In eight cases the difference between two such "replications" amounted to more than 50% of their mean. In these cases both measurements, each consisting of eight readings, were repeated; a procedure that does not introduce bias into the mean. Great care was taken to measure only mitoses which were well inside the section. In the case of telophases this applied to both daughter nuclei which were always measured together. Within a given section, all mitoses, from prophase through telophase, which were in this sense complete, were measured except when foreign matter in the slide interfered. Therefore, the data represented random samples of mitoses.

The results of the DNA measurements are summarized in Fig. 1. In spite of the errors introduced by non-specific absorption, the  $4C$  class is fairly well defined in both experiments. In each case the geometric mean DNA content (i.e. the anti-logarithm of the arithmetic mean of the logarithms of the nuclear DNA values) can, therefore, be used as an estimate of the  $4C$  value. Although the A and B slides had been stained at different times, the two  $4C$  estimates agree fairly well: A:  $4C = 25.5$  ( $n = 27$ ); B:  $4C = 28.3$  ( $n = 42$ ). As class limits, the values  $2C \sqrt{2}$ ,  $4C \sqrt{2}$ ,  $8C \sqrt{2}$ , and  $16C \sqrt{2}$  were used which correspond to the logarithmic half way points between

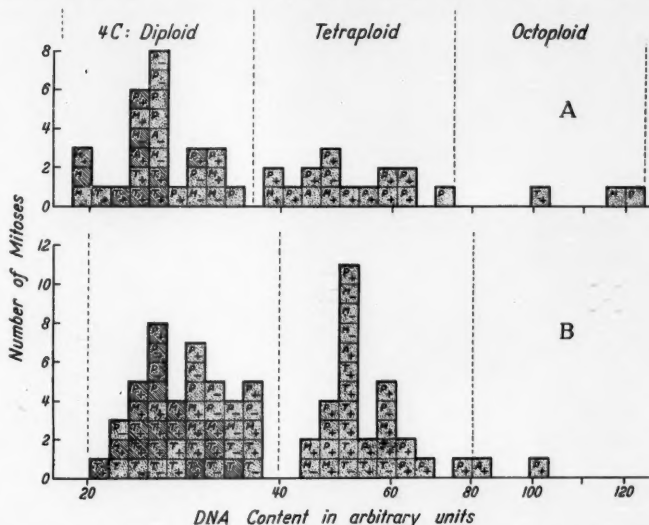


Fig. 1. Ploidy of mitotic nuclei according to their DNA content in experiments A (2—6 days) and B (2—16 days). *P* prophase, *M* metaphase, *A* anaphase, *T* telophase. + radio-active, — non-radioactive, neither + nor —: radioactivity unknown. Shaded: new cells; stippled: old cells

class values. All mitoses falling into the first, second, or third class were scored as diploid, tetraploid, or octoploid respectively (Fig. 1). The number of conceivably misclassified mitoses is obviously not great enough to matter in the context of the present study. The above method is certainly more reliable than an estimation of the polyploidy class from the microscopic impression. Such an estimation was attempted; it led in about 9% of nuclei to a classification different from that by DNA value.

More than one hundred mitoses were analyzed by all methods used in this study. The identification of the mitotic stages, the classification of cells as "new" or "old", and the DNA determinations had to be done, in dehydrated and mounted sections, prior to the preparation of the autoradiographs. Before the film could be applied, it was necessary to remove the cover slips and to bring the slides back, by steps, into water. In the process, a few of the classified and measured mitoses were lost.

The temporary dehydration left the tissue harder than it had been previously. Consequently, the drying of the sections and the superimposed film did not cause squashing of the tissue to the extent described by Das *et al.* (1958). In an appreciable number of cases the hardened tissue kept the film beyond the effective range of the radiation coming from a nucleus. This was clearly evident in some nuclei above which the density of silver grains ranged from that of the general background in some areas to a very high concentration in others (Fig. 2). Similar differences were found between the two daughter nuclei of a few telophases<sup>1</sup>. No comparable

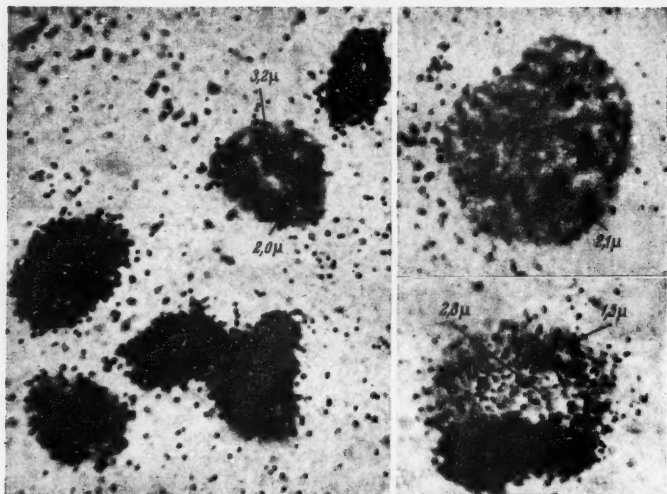


Fig. 2. Autoradiographs of Feulgen stained nuclei. Left: new cells (8 days), a prophase (with distances between highest Feulgen stained particle and lowest silver grain) and five interphases. Right: old cells (8 days), non-radioactive and radioactive prophase. 1000  $\times$

variation had been observed in the autoradiographs studied by Das *et al.* (1958). In order to provide a basis for identifying genuinely non-radioactive nuclei, the distance of the film from the nucleus was determined at representative spots and correlated with the density of silver grains at the same spots.

The density was ranked as "high", "medium", "low", or "background". The only crucial distinction was that between "low" and "background". This was very rarely in doubt. The distance between the film and the nucleus is here understood as the distance between the lowest silver grain at a certain spot and the highest Feulgen stained particle beneath the grain. This distance was measured with oil immersion by means of the fine adjustment of the microscope. Tenths of a micron were estimated. It is important never to invert the direction of movement when taking a pair of readings as otherwise backlash might introduce errors. If the point

<sup>1</sup> The completely irregular character of this phenomenon distinguishes it sharply from the genuine non-uniformity of radioactivity by means of which LIMA-DE-FARIA (1959) so elegantly demonstrated a different timing of DNA synthesis in euchromatin and heterochromatin.

of sharpest focus is over-shot when the movement is stopped to make a reading, the entire procedure must be repeated. Three pairs of readings, taken with alternating directions of movement, were averaged. Measurements by both authors on a number of spots were in satisfactory agreement.

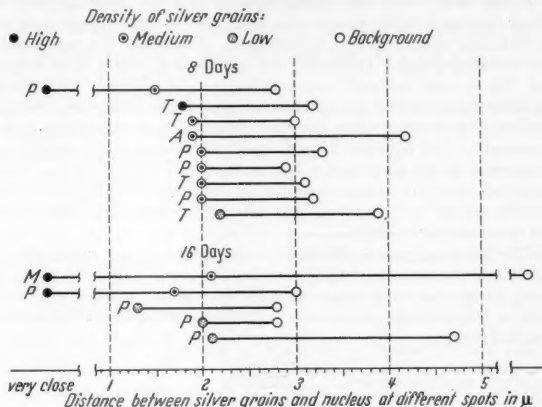


Fig. 3. Silver grain density determined by distance between radioactive nucleus and film. Each horizontal line represents one mitosis. *P* prophase, *M* metaphase, *A* anaphase, *T* telophase

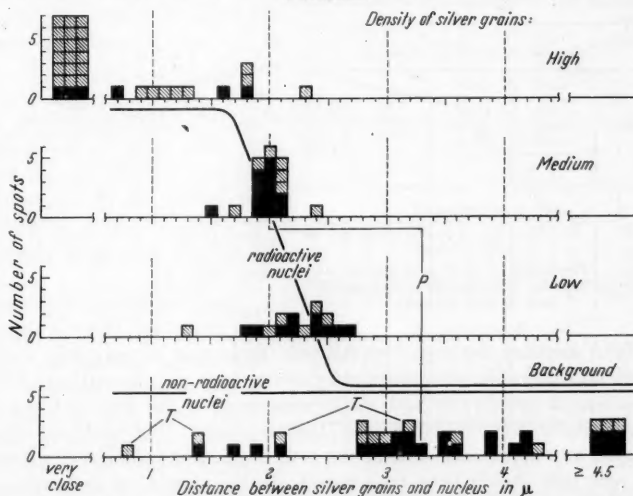


Fig. 4. Possibility of demonstrating presence or absence of radioactivity in nuclei depends on their distance from film. The data of Fig. 3 are included. *P* two spots in the same prophase, *T* pairs of telophase nuclei. Black: 8 days, shaded: 16 days of culture

The measurements on two or three spots each of several nuclei are given in Fig. 3. The correlation between silver grain density and distance is striking. It is equally clear in Fig. 4. Nuclei with a closest distance to the film of three or more micra never showed a recognizable accumulation of silver grains although most of these mitoses must have been radioactive as were the great majority of those mitoses that happened to lie close to the film. On the other hand, it is also clear that with distances of  $2.1 \mu$  or less, radioactivity of a nucleus if present would show up in the autoradiograph. Therefore, the six mitoses within that range at the bottom of Fig. 4 were certainly non-radioactive. In general, all mitoses above which the silver grain density clearly exceeded that of the background were counted as radioactive. In all other cases the shortest distance between film and nucleus was determined. If this equalled  $2.5 \mu$  or more, the mitosis was dismissed as inconclusive, otherwise it was scored as non-radioactive. It is believed that this procedure eliminated errors of classification almost completely; if there had been any, they probably would have resulted in a very slight under-estimation of the frequency of non-radioactive mitoses.

Altogether 292 mitoses were classified as radioactive or non-radioactive. Among these were 103 of which the polyploidy class was determined by DNA measurements. In addition, 14 mitoses were measured that were either subsequently lost in the preparation of the autoradiographs or too far beneath the film to be conclusive as to their radioactivity.

### C. Results

#### I. New Cells

"New" cells can be defined as those resulting from divisions that had taken place in culture. They are recognized by the appearance of the

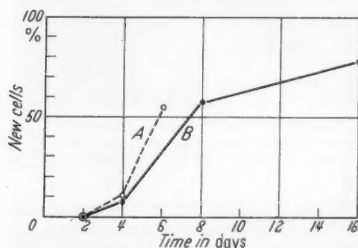


Fig. 5. Frequency of new cells among cells found in mitosis. Experiments A (215 mitoses) and B (284 mitoses)

cell walls. The relative frequency of new cells naturally increases sharply with time (Fig. 5). It had been reported before (PATAU *et al.* 1957) that all mitoses in new cells seem to be diploid. This was confirmed in the present study: all 28 mitoses in new cells that were measured fell into the 4 C, *i.e.* the diploid class (Fig. 1).

Except in the case of chromosome reduction, there is always a DNA doubling between two mitoses. Reduction of polyploid nuclei with multistranded chromosomes by two or more mitoses without DNA doubling is conceivable and would correspond to the case of *Culex* as reported by BERGER (1938) and GRELL (1946). Had such reduction played any appreciable role in the pith tissue, non-radioactive mitoses in new cells should have been found. In the absence of reduction all mitoses in new cells should be radioactive. There were 160 such mitoses, including those that were not measured, for which the presence or

absence of radioactivity could be ascertained: all proved to be radioactive. Evidently, the diploidy of new cells was due to selection of cells that always had been diploid.

## II. Old Cells

A mitosis in an "old" cell represents the first mitosis that had occurred in the cell in culture, in fact, the first mitosis after a long interval as no mitosis were found in pith tissue *in situ*. If, after a prolonged dormant period, nuclear reproduction always has to start with DNA doubling, all mitoses in old cells should be radioactive as they were in new cells. Yet in both experiments after two days of culture about 50% of mitoses in old cells were non-radioactive (Fig. 6).

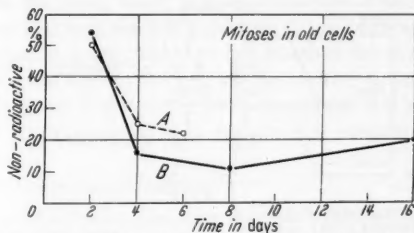


Fig. 6. Frequency of mitoses (in old cells) that had not been preceded by DNA synthesis in culture. Experiments A (128 mitoses) and B (164 mitoses)

Assume for the moment that in these non-radioactive nuclei DNA doubling had taken place before the tritiated thymidine in the culture medium had reached the nuclei. If so, one should expect that there were also nuclei in which tritiated thymidine had attained significant levels only during DNA synthesis. Such nuclei would range from non-radioactive to strongly radioactive. Das *et al.* (1958) had stressed that such variation seemed to be practically absent: an interphase nucleus either was or was not strikingly radioactive, except for an occasional nucleus which presumably had been fixed when in the process of DNA synthesis. The present observations reinforced this impression, for radioactive mitoses that were close to the film always produced a high silver grain density. It is, therefore, concluded that the tritiated thymidine had reached all nuclei

Table 1. Mitoses in old cells

Age of Culture in Days	Diploid (4 C) radioactive		Tetra-ploid (8 C) radioactive		Octo-ploid (16 C) radioactive		Total
	+	—	+	—	+	—	
	Experiment A						
2	4	6	3	0	0	0	13
4	1	0	7	1	0	0	9
6	1	1	2	0	1	0	5
Total	6	7	12	1	1	0	27
Experiment B							
2	2	7	8	5	0	0	22
4	7	1	9	2	2	0	21
8	1	2	4	0	0	0	7
16	0	2	0	0	0	0	2
Total	10	12	21	7	2	0	52



before DNA doubling had commenced and that the non-radioactivity of certain mitotic nuclei is evidence that these nuclei had not undergone DNA synthesis in culture.

Even after eight and 16 days, definitely non-radioactive mitoses still occurred (four and two mitoses respectively: Fig. 4). It is noteworthy

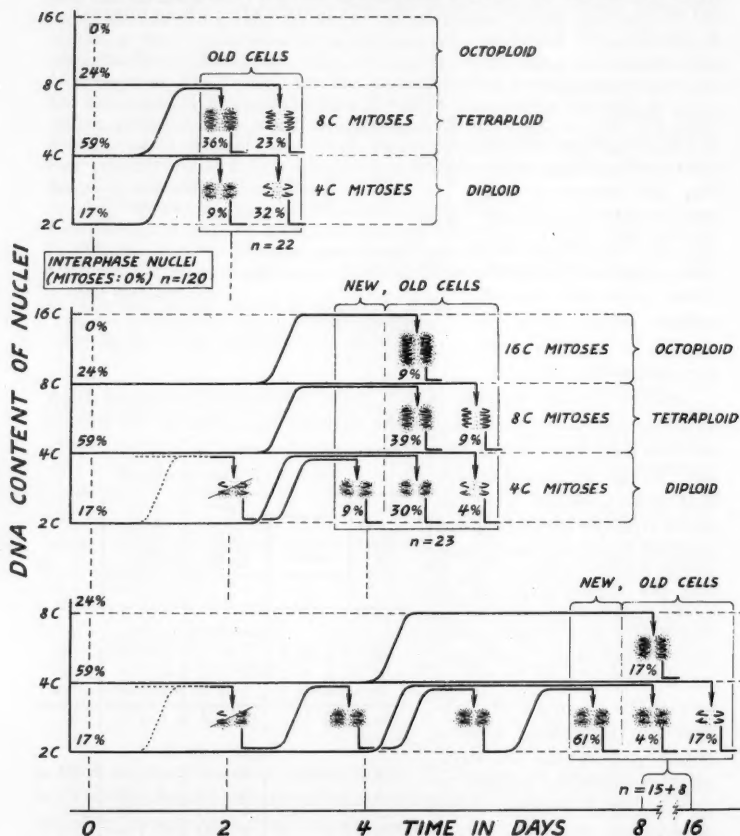


Fig. 7. Diagram summing up experiment B (completely analyzed nuclei only).  $n$  number of nuclei sampled at time given at bottom. Stippling of mitoses symbolizes radioactivity

that after four days of culture the frequency of non-radioactive mitoses among dividing old cells did not seem to decline further. The relatively higher value of that frequency after only two days of culture is not sur-

prising. Nuclei which entered mitosis with their original DNA content were more likely to be found among the early mitoses than those which first underwent DNA doubling.

All completely classified mitoses are listed in Table 1. Fig. 7 illustrates the meaning of these data. A radioactive diploid mitosis in an old cell, for instance, represents a 4 C nucleus that had undergone DNA doubling in culture. Therefore, at the beginning of culture it must have had the DNA content 2 C. On the other hand, a non-radioactive diploid mitosis represents a nucleus that had the DNA content 4 C throughout culture. It will be noted that it is impossible to tell whether the first mitosis in culture in the lineage of a given new cell was radioactive or not, in other words, whether that cell had derived from an original 2 C or from an original 4 C cell. It is probable that both modes occurred.

### III. Intercellular Selection

In Table 2 the mitoses in old cells of experiment B are listed according to the DNA contents of these nuclei at the beginning of culture (4th and

Table 2. *Test for an effect of the DNA class on the probability of mitosis in old cells. See text*

Polyploidy Class	Radio-active	Number of Mitoses: 2nd-16th Day of Culture <sup>1</sup>	At the Beginning of Culture		
			DNA Class	Number of Interphase Nuclei:	
				Observed later in Mitosis	Observed at Beginning <sup>2</sup>
Diploid	+	10	2C	10	20
	-	12	4C	33	71
Tetraploid	+	21	8C	9	29
	-	7			
Octoploid	+	2			
	-	0			
Total		52		52	120

Test of homogeneity of last two columns:  $\chi^2_2 = 1.03$ ;  $P = 0.6$ .

<sup>1</sup> From Table 1, Experiment B.

<sup>2</sup> From data represented in Figure 3 of the paper by DAS *et al.* (1958).

5th column). At this time, the frequencies of the classes from 2 C through 8 C among nuclei that were later found in mitosis agree well with the frequencies of these classes in a simultaneous random sample of interphase nuclei (last column). Among the former there is some deficit of 8 C relative to 4 C nuclei ( $9:33 = 1:3.7$ ) when compared with the random sample ( $29:71 = 1:2.4$ ) but this deficit is statistically insignificant ( $\chi^2_1 = 0.84$ ;  $P = 0.36$ ). It seems, therefore, that the DNA class had only an moderate, if any, effect on the probability of nuclei to undergo

a mitosis in the cultured tissue within a given time. This contrasts sharply with the severe restriction that a high DNA content evidently imposed upon the probability of a further DNA doubling. PATAU *et al.* (1957) have already pointed out that "the great majority of 8 C nuclei did not undergo DNA synthesis". They added: "it seems that the relatively few cells of high ploidy classes which did double their DNA contents could enter into mitosis when the auxin and kinin requirements were fulfilled, for some mitoses with chromosome numbers corresponding to the highest observed DNA classes were found". Table 2 confirms that mitosis was, if at all, much less inhibited by a high DNA class than was DNA synthesis.

The strongest evidence of intercellular selection in favor of low ploidy in cultured pith tissue lies, of course, in the fact that only cells with diploid mitoses were found to continue to divide. It appears possible that this selection, too, was caused by difficulties, in polyploid cells, of DNA synthesis rather than of mitosis. In the diploid cells only 2 C nuclei had to undergo DNA doubling, in the other cells 4 C or 8 C nuclei, if divisions were to continue beyond the first mitosis in culture. Perhaps in the present material 4 C and 8 C nuclei required so much more time than 2 C nuclei to become ready for DNA doubling after a mitosis that for this reason no tetraploid and octoploid divisions have been found in new cells.

#### D. Discussion

It has by now been widely accepted that in the absence of DNA synthesis the DNA content of a nucleus is, at least approximately, proportional to the number of homologous chromatid sets that would appear if the nucleus were to enter mitosis. The term "chromatid" is used here to designate the equivalent of a half-chromosome in a normal prophase. Chromatids behave as mechanical units and in the present context it is irrelevant how many identical "strands", visible or sub-microscopic, a chromatid may contain. Strict proportionality between the DNA content and the number of chromatid sets would imply, first, that the process of DNA synthesis, once begun, always continues until, and only until, every chromosome section in the nucleus has exactly doubled its DNA content and, second, that the doubling of the DNA content of a chromatid eventually leads to the formation of two distinct sister chromatids.

Exceptions to the first implication have been claimed repeatedly but in most of these cases we do not feel that the various error sources of the microspectrophotometric method have been analyzed sufficiently to render such claims convincing in the face of a great deal of evidence indicating a one-to-two relationship between successive DNA classes. There are, however, some well established cases (all concerning

giant chromosomes of Diptera) which contradict the proposition that synthesis of DNA always results in its doubling in all chromosome sections. In these cases the aberrant behavior of DNA reproduction has been observed in special sections which are either typically heterochromatic or can be interpreted as heterochromatic, even though the authors may not have chosen to do so (FICQ and PAVAN 1957, OWCZARZAK and PATAU: unpublished results on *Drosophila*; PAVAN 1959, RUDKIN and CORLETTE 1957, STICH and NAYLOR 1958). After all, a differential DNA reproduction will necessarily manifest itself as differential Feulgen staining, in other words, as heteropyknosis. For the euchromatin hypothesis of strict DNA constancy can still be maintained and it is possible that in the ordinary mitotic cycle it is also valid for the heterochromatin<sup>1</sup>. At any rate, in most organisms, including *Nicotiana*, heterochromatin is not present in such quantities that an aberrant reproduction of its DNA would cause appreciable deviations from proportionality between the total nuclear DNA content and the number of chromatid sets.

Any exception to the second implication of that proportionality could be readily recognized microscopically in favorable material for it would result in chromatids which have twice the normal dye content in Feulgen stained slides. With very rare exceptions, homologous chromatids in, say, metaphases of a given organism appear to have about the same Feulgen dye content and the same structural appearance, except that they may vary in the degree of contraction. However, there are a few reports indicating that DNA doubling had resulted in chromatids of doubled volume rather than in two ordinary chromatids (cf. GEITLER 1953). Indeed, there is little doubt that this process has occurred repeatedly in evolution and accounts for the great differences in chromosome volume found in many plant and animal groups. It appears altogether unlikely that such differences reflect corresponding differences in the numbers of gene loci rather than differences in the submicroscopic multiplicity of the "gene string".

Apart from such very rare exceptions, any DNA doubling means in effect a chromatid reproduction in the sense of a doubling of the number of chromatids, even though the actual separation into distinct sister chromatids may possibly be delayed. At present it is impossible to determine when this separation takes place; we cannot even define precisely what constitutes a separation. DNA synthesis is undoubtedly

<sup>1</sup> Asynchrony of DNA synthesis as recently reported for several organisms (*Melanoplus* and *Secale*: LIMA-DE-FARIA 1959; Chinese hamster: TAYLOR 1960) amounts to a prolongation of the period of synthesis and is compatible with strict DNA constancy. It appears possible that "asynchronous duplication" of DNA also accounts for all of the above-mentioned cases of aberrant behavior of DNA reproduction in polytene chromosomes (cf. TAYLOR 1960).

a necessary part of normal chromatid reproduction and it is to-date also its only aspect that can be reliably recognized when it occurs. DNA doubling may be considered as representing, *pars pro toto*, the reproductive phase of the mitotic cycle.

In young pith tissue cultures, DNA doubling in nuclei was found before the appearance of the first mitoses, yet only about 50% of the nuclei observed in mitosis after two days of culture had undergone DNA synthesis. The other mitoses represented nuclei that still had the same DNA content, 4C or 8C, which they had previously built up in the plant — probably in many cases weeks before the excision of the pith tissue. After 16 days of culture, the longest period investigated, two nuclei were still found to enter mitosis with the DNA content, 4C, which they had at the beginning of culture. The fact that, in experiment B, during the period from the fourth to the 16th day the frequency of non-radioactive mitoses among dividing old cells showed no decrease (Fig. 6) suggests that this capability can be retained for a much longer period. The results make it highly questionable whether there is any limit to the time when mitosis can still start without a new DNA doubling.

The same timing, DNA synthesis in the tissue occurring before the onset of mitoses, has also been observed in regenerating liver (PRICE and LAIRD 1950, JARDETSKY *et al.* 1956). In view of our results it appears possible that in liver, too, at least some mitoses were not preceded by a recent DNA doubling in the same nucleus. It is known that in liver there is no lack of nuclei with DNA contents of at least 4C, the minimum amount required for a mitosis in a diploid organism.

As pointed out previously, either of the two processes, DNA synthesis or mitosis, may be blocked in the course of normal development in a tissue in which the other may still take place (PATAU 1952, PATAU and SWIFT 1953). This is shown conclusively by the occurrence of tissues with only, or almost only, 2C nuclei (*e.g.* the promeristem of *Tradescantia* buds: NAYLOR 1958, the central cell files in the elongation zone of roots of *Rhoeo*: PATAU 1952) or with no 2C nuclei (*e.g.* the central cell files in the elongation zone of onion roots: SRINIVASACHAR 1953). Correspondingly, DNA synthesis can be induced by kinetin in cultured pith tissue without being followed by mitosis (PATAU *et al.* 1957, DAS *et al.* 1958), a situation similar to that in many tissues, especially in plants, in which repeated DNA duplication in the absence of mitosis leads to somatic polyploidy (see below). A treatment that induces mitosis but not DNA synthesis has not yet been discovered but there seems to be no reason why eventually this should not also be found.

Of course, neither mitosis nor DNA synthesis can go on indefinitely without the other. In diploid tissue, normal mitosis becomes impossible

once only 2 C nuclei are left, and although DNA synthesis can occur repeatedly in a nucleus without alternating mitoses, there is bound to be a physiological limit in every organism to the number of successive DNA doublings. In the cultured pith tissue used, that number rarely exceeded two. However, apart from such limitations, DNA synthesis and mitosis appear as entirely different and basically independent processes<sup>1</sup>.

The present findings underline this independence. At the beginning of culture 4 C and 8 C nuclei may be induced into DNA synthesis or into mitosis. To obtain continued growth in differentiated tissue, appropriate conditions must be present to meet the requirements of both DNA synthesis and mitosis. In view of the present results it is conceivable that generally the first mitotic cycle may begin with either process, at least in those nuclei in which the last process had been a DNA doubling rather than a mitosis (see below). At any rate, when it comes to the problem of how to stop such growth, both processes deserve, in principle, equal attention: an agent which blocks mitosis would in the end be no less effective than one which blocks DNA synthesis. However, there may be many agents that do not interfere directly with one or the other of these processes but rather with a biological mechanism controlling both. Such agents would block both processes more or less simultaneously.

Biological necessity requires that in embryonic tissue DNA synthesis and mitosis be closely correlated: they must co-occur in the tissue and, furthermore, they must alternate in each cell. There evidently was a selective premium on evolving control mechanisms which could render the initiation of both processes possible or impossible at about the same time. If both processes are blocked simultaneously, the tissue emerging from the embryonic period will contain a mixture of 2 C and 4 C nuclei, for it seems that DNA doubling, no less than mitosis, is normally always completed once it has started. Such a mixture is found in many differentiated tissues. The IAA-kinetin system appears as a model of a common control mechanism. Both substances were found to increase the incidence of DNA synthesis and of mitosis (in the case of mitosis kinetin becomes effective only if IAA is also present), and it seems likely that kinetin and IAA, or functionally similar substances, are necessary requirements for both processes (PATAU *et al.* 1957).

<sup>1</sup> FIRKET (1957), on the basis of an extensive study of DNA synthesis in tissue cultures of chick fibroblasts and myoblasts by means of Feulgen measurements and autoradiographs (also using tritiated thymidine), comes to a similar conclusion: "... malgré leur liaison dans les cellules normales, on peut, expérimentalement, dissocier complètement synthèse de l'ADN et mitose."

In embryonic tissue there must be two further mechanisms to ensure the regular alternation of DNA doubling and mitosis: a first mechanism to prevent two DNA doublings in succession, and a second one to render successive mitoses impossible. The first mechanism manifested itself also in cultured pith tissue once cells had started to divide repeatedly. In new cells the alternation of DNA doubling and mitosis seemed to be perfect, for in these cells, in which only diploid mitoses were found, no 8 C nuclei were observed. However, the first mechanism did obviously not operate in old cells. Because of the complete absence of mitoses *in situ*, it appears likely that the last mitoses had all taken place during the meristematic period and had, therefore, been diploid. Consequently, it appears that every radioactive 8 C or 16 C nucleus had in culture undergone the last of two or three successive DNA doublings. These had probably been separated from each other by relatively long time intervals.

The above suggests that the first mechanism consists of a temporary block which every DNA synthesis sets up against its own repetition. Conceivably, this block might be simply a state of exhaustion of DNA precursors. This block, whatever its nature, may be assumed to last a sufficient time to ensure that under the favorable conditions of an embryonic tissue a mitosis will be initiated before the block disappears. When it disappears, say, during differentiation, the nucleus becomes ready for another DNA synthesis while retaining the capability to enter mitosis. If conditions, for instance those of culture, should once more permit DNA doubling and mitosis, the decision which one is triggered first in a given cell may depend on local factors. In cultured pith, the incidence of DNA doubling in 8 C nuclei is much smaller than that in 4 C nuclei. This could well be due to a progressively increased duration in higher DNA classes of the postulated block against another DNA doubling. It has been pointed out above that this might explain the fact that polyploid mitoses have not been observed in new cells.

Two mitoses in succession, *i.e.* without an intervening DNA doubling (chromosome reproduction) are, of course, characteristic for meiosis as well as for the kind of regular somatic reduction which occurs in *Culex* according to BERGER (1938) and GRELL (1946). In either case chromatid pairing is essential to render regular segregation possible. Somatic pairing is, however, not of very common occurrence and as the association of more than two chromatids in endopolyploid nuclei is ordinarily dissolved entirely during a single mitosis, two mitoses in succession would usually lead to a completely irregular, if any, segregation of chromosomes. It appears, therefore, biologically desirable to have a mechanism for preventing indefinitely a succession of two mitoses, except under the special conditions of somatic or meiotic reduction. Such a



mechanism seemed to operate in pith tissue, for there were no indications that a mitosis ever followed directly upon a mitosis. However, there were also no indications of limits to the time between a DNA doubling and the subsequent mitosis. Obviously, DNA doubling is not needed as an immediate trigger to start mitosis but is apparently required to bring about a long-lasting, possibly permanent, internal condition without which nuclei in ordinary somatic tissue will not enter mitosis even under favorable external conditions. That internal condition could possibly be the existence of sister chromatids in close pairing, a state which might have some gene-physiological effects. There is no evidence that sister chromatids ever fall apart during interphase.

It is perhaps pertinent to note that the exclusive occurrence of 2 C nuclei in the promeristem of *Tradescantia* buds still appears biologically advantageous even though the present results show that 4 C nuclei in non-dividing tissue do not necessarily lose their capability to enter, under proper conditions, a diploid mitosis. If the present findings may be generalized, it would seem that in a promeristem containing 4 C nuclei some of these would react upon the restoration of meristematic conditions by becoming 8 C which would render a subsequent mitosis tetraploid. Polyploidy in a meristem is obviously biologically undesirable and occurs but as a rare accident.

In differentiating tissue, on the other hand, polyploidization of some or all nuclei occurs in many plants and animals and although it displays an almost infinite variety in detail it is always the result of two DNA doublings between which mitosis was completely omitted, or aborted, or took place but was later undone in its segregating effect by fusion after failure of cytokinesis. Some major types of somatic polyploidization are illustrated in Fig. 8. In tobacco pith tissue polyploidization by an apparently complete omission of mitosis takes place *in situ* as well as in culture, even without addition of IAA or kinetin (Das *et al.* 1958), and this seems to be the most common type of somatic polyploidization in differentiated tissue at least in Phanerogams. Usually the four chromatids per chromosome that result from two successive DNA doublings in an original 2 C nucleus remain connected at the centromere so that diplochromosomes appear in a subsequent prophase, but it seems that a complete separation of sister chromosomes may also occur (Tschermak-Woess 1956). Abortion of mitosis by a failure of the nuclear membrane to dissolve and a failure of spindle formation is a normal process in differentiating tissues of many organisms, especially animals. Abortion by omission of spindle formation (colchicine effect) is an abnormality but tends to lead to the same result. Reversal of segregation is apt to occur after a failure of cytokinesis as this renders a future fusion of sister nuclei possible, usually during metaphase.

Ordinarily this is an abnormality, but in mouse liver it has become part of the normal development.

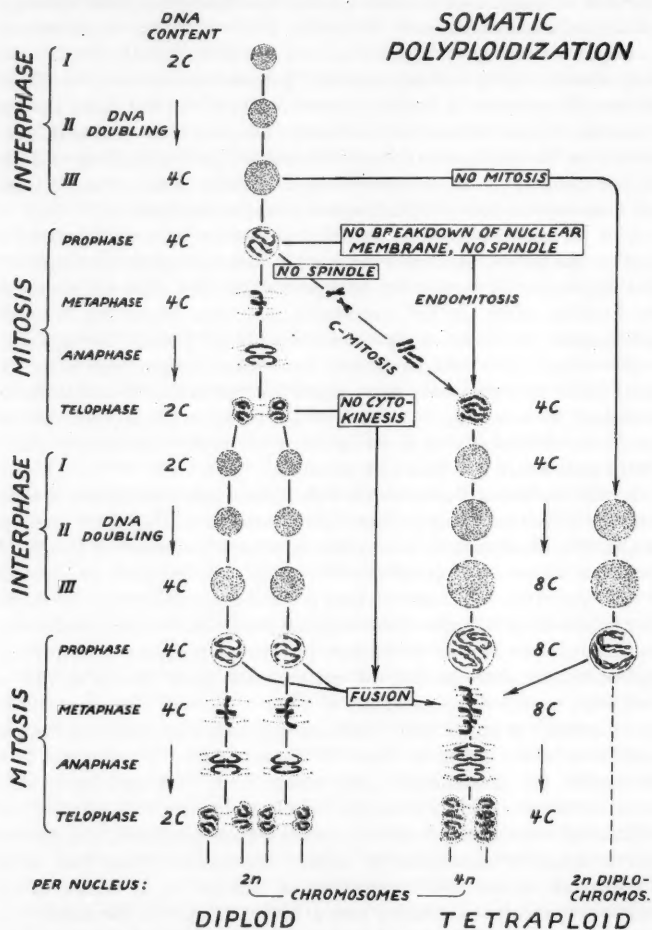


Fig. 8. Left: two normal mitotic cycles; right: different pathways leading to somatic tetraploidy and, by repetition, higher degrees of polyploidy incl. polyteny

We have nothing but admiration for GEITLER's work on endopolyploidy and for his review of this vast and confusing body of facts

(GEITLER 1953), but we feel that the time has come for a re-examination of his term "endomitosis". He defines it as "... die im natürlichen Ablauf der Entwicklung eines Organismus erfolgende Zweitteilung der Chromosomen bzw. ihrer Äquivalente im Zellkern ohne Bildung einer Spindel und ohne Teilung des Kerns ...".

The objections that may be raised to this involve the question of what shall be understood by "mitosis". In established usage the term is synonymous with "mitotic nuclear division" and covers, therefore, the stages from prophase to telophase but excludes interphase. If the division of the chromosomes during interphase were to be included, it would be necessary to consider DNA synthesis as a part of mitosis, for it is likely that DNA doubling is not only a necessary condition for, but an inseparable part of the process of chromosome division. PATAU and SWIFT (1953) have pointed out that it is wholly impractical to include DNA synthesis under the term "mitosis". If, however, "mitosis" is understood in the conventional sense, the most common type of somatic polyploidization in plants (*e.g.* tobacco pith tissue) can be characterized, as was done above, as a complete omission of mitosis between two DNA doublings or chromosome divisions. In the absence of all mitotic processes, "endomitosis" appears as a misnomer.

It would be best to follow D'AMATO's advice (1954) — "to keep ... 'endomitosis' in a strict sense separate from 'interphase supernumerary chromonemal reproduction'", in other words, to limit the term "endomitosis" to those cases in which prophase chromosomes are developed but the nuclear membrane is not dissolved and no spindle is formed. This, after all, is about the meaning with which GEITLER (1939) had originally endowed the term. Endomitosis, thus understood, is but one of the possible manifestations of an abortive mitosis which may take place between the two successive DNA doublings that bring about somatic polyploidization.

A diploid interphase III and a tetraploid interphase I have the same DNA content,  $4C$ , and, at least if only the late interphase III is considered, the same number of chromatids. This is also true for a tetraploid interphase III and an octoploid interphase I ( $8C$ ), and so forth. Therefore, diploidy, tetraploidy, etc. of interphase nuclei can be defined only by reference to the number of chromatids that will appear in the next mitosis. What this will be is known in a normal meristem but not in differentiated tissue. When tobacco pith is taken into culture,  $4C$  nuclei may go directly into a diploid mitosis or into DNA synthesis and then into a tetraploid mitosis. Previously, it appeared possible that eventually every DNA class in differentiated tissue could be identified with a specific polyploidy class. It is now evident that no such generally valid one-to-one relation exists, except that in a diploid

organism somatic 2 C nuclei may be called diploid and nuclei with DNA contents of 8 C, or more, polyploid.

It is conceivable that in the future criteria other than the DNA content will be discovered for recognizing 4 C nuclei that cannot under any circumstances enter a diploid mitosis but may undergo DNA synthesis and a tetraploid mitosis thereafter. Such, and only such 4 C nuclei could be labelled tetraploid. However, in view of the present results it appears entirely possible that in differentiated tissue every 4 C interphase nucleus that is still capable of DNA synthesis is also capable of entering mitosis directly, in other words, that every such 4 C nucleus is potentially diploid as well as tetraploid. If this were so, the specific terms "diploid", "tetraploid", and so forth, would not only at present but in principle be inapplicable to interphase nuclei in differentiated tissue.

LEVAN (1939) and HUSKINS and STEINITZ (1948) have discussed the question as to whether the induction of mitosis in differentiated tissue by auxin merely revealed existing polyploidy or whether, as LEVAN thought, the auxin created it. In part this question has now become a semantic one. If the treatment causes a 4 C nucleus to undergo a DNA doubling and then a tetraploid mitosis, it is just as legitimate to say that the treatment has revealed the tetraploid potential of the 4 C nucleus as it is to say that it has created a definite tetraploid state by eliminating the diploid potential of the nucleus. On the other hand, if the treatment initiates a tetraploid mitosis in a nucleus that was 8 C to begin with, it merely reveals existing polyploidy. The same can generally be said in the case of an early octoploid mitosis, for it appears very unlikely that two DNA doublings in rapid succession should have preceded the mitosis. The whole question, of course, has lost its former importance. The karyological state of a differentiated tissue can be defined in terms of DNA classes but not in terms of polyploidy classes, and the frequencies of DNA classes can now be determined readily by DNA measurements.

### Summary

DNA synthesis and mitosis were initiated in cultured tobacco pith tissue by means of IAA and kinetin. DNA classes were determined by microspectrophotometric measurements (Feulgen); autoradiographs (tritiated thymidine) served to ascertain whether or not nuclei had undergone DNA synthesis during culture.

All mitoses in "new" cells (resulting from divisions in culture) were diploid and had been preceded by DNA synthesis in culture.

Whereas many of the "old" cells (which had not previously divided in culture) found in diploid or polyploid mitosis had undergone DNA

synthesis during culture, others had not. Such non-radioactive mitoses still occurred after 16 days.

In view of this, a 4C nucleus in differentiated tissue should be considered as potentially both diploid and tetraploid, for it appears impossible to predict whether it would, upon restoration of conditions conducive to DNA synthesis and mitosis, enter a diploid mitosis or, after undergoing DNA synthesis, a tetraploid one.

A high nuclear DNA content seems to have a much more inhibiting effect on the onset of DNA doubling than on that of mitosis.

Somatic polyploidization is understood as the result of two DNA doublings between which mitosis was omitted, or aborted, or in effect undone by a failure of cytokinesis leading to fusion during a later mitosis.

### Literature

- BERGER, C. A.: Multiplication and reduction of somatic chromosome groups as a regular developmental process in the mosquito, *Culex pipiens*. Publ. 496 Carnegie Inst. Wash., 209—232 (1938).
- D'AMATO, F.: A brief discussion on "endomitosis". *Caryologia* (Firenze) **6**, 341—345 (1954).
- DAS, N. K., K. PATAU and F. SKOOG: Initiation of mitosis and cell division by kinetin and indole-acetic acid in excised tobacco pith tissue. *Physiol. Plantarum* (Cph.) **9**, 640—651 (1956). — Autoradiographic and microspectrophotometric studies of DNA synthesis in excised tobacco pith tissue. *Chromosoma* (Berl.) **9**, 606—617 (1958).
- FICQ, A., and C. PAVAN: Autoradiography of polytene chromosomes of *Rhynchosciara angelae* at different stages of larval development. *Nature* (Lond.) **180**, 983—984 (1957).
- FIRKET, H.: Recherches sur la synthèse des acides désoxyribonucléiques et la préparation à la mitose dans des cellules cultivées "in vitro". (Etude cytophotométrique et autoradiographique.) *Arch. Biol. (Liège)* **69**, 1—166 (1957).
- GEITLER, L.: Die Entstehung der polyploiden Somakerne der Heteropteren durch Chromosomenteilung ohne Kernteilung. *Chromosoma* (Berl.) **1**, 1—22 (1939). — Endomitose und endomitotische Polyploidisierung. *Protoplasmatologia* **6c**, 1—89 (1953).
- GRELL, M.: Cytological studies in *Culex*. I. Somatic reduction divisions. *Genetics* **31**, 60—76 (1946).
- HUSKINS, C. L., and L. M. STEINITZ: The nucleus in differentiation and development. II. Induced mitoses in differentiated tissues of *Rhoeo* roots. *J. Hered.* **39**, 67—77 (1948).
- JARDETSKY, C. D., C. P. BARNUM and H. VERMUND: Deoxyribonucleic acid and phospholipide metabolism in regenerating liver and the effect of X-radiation. *J. biol. Chem.* **222**, 421—433 (1956).
- LEVAN, A.: Cytological phenomena connected with the root swelling by growth substances. *Hereditas* (Lund) **25**, 87—96 (1939).
- LIMA-DE-FARIA, A.: Differential uptake of tritiated thymidine into hetero- and euchromatin in *Melanophus* and *Secale*. *J. biophys. biochem. Cytol.* **6**, 457—466 (1959).
- NAYLOR, J. M.: Control of nuclear processes by auxin in axillary buds of *Tradescantia paludosa*. *Canad. J. Bot.* **36**, 221—232 (1958).

- PATAU, K.: The DNA content of nuclei in root tips of *Rhoeo discolor*. *Rec. Gen. Soc. Amer.* **21**, 56 (1952).
- N. K. DAS and F. SKOOG: Induction of DNA synthesis by kinetin and indole-acetic acid in excised tobacco pith tissue. *Physiol. Plantarum (Cph.)* **10**, 949—966 (1957).
- , and H. SWIFT: The DNA-content (Feulgen) of nuclei during mitosis in a root tip of onion. *Chromosoma (Berl.)* **6**, 149—169 (1953).
- PAVAN, C.: Morphological and physiological aspects of chromosomal activities. *Proc. 10th Internat. Congr. Genetics* **1**, 321—336 (1959).
- PRICE, J. M., and A. K. LAIRD: A comparison of the intracellular composition of regenerating liver and induced liver tumors. *Cancer Res.* **10**, 650—658 (1950).
- RUDKIN, G. T., and S. L. CORLETTE: Disproportionate synthesis of DNA in a polytene chromosome region. *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)* **43**, 964—968 (1957).
- SRINIVASACHAR, D.: The DNA-content of nuclei in the meristem of onion roots. *Ph. D. Thesis*, Univ. of Wisconsin 1953.
- STICH, H. F., and J. M. NAYLOR: Variation of desoxyribonucleic acid content of specific chromosome regions. *Exp. Cell Res.* **14**, 442—445 (1958).
- TAYLOR, J. H.: Asynchronous duplication of chromosomes in cultured cells of Chinese hamster. *J. biophys. biochem. Cytol.* **7**, 455—464 (1960).
- TSCHERMAK-WOESS, E.: *Karyologische Pflanzenanatomie*. *Protoplasma (Wien)* **46**, 789—834 (1956).

Dr. K. PATAU  
Department of Pathology,  
University of Wisconsin,  
Madison, Wisc. USA

Dr. NIRMAL K. DAS  
Department of Zoology,  
University of California,  
Berkeley 4, Calif., USA

Aus dem Institut für Kulturpflanzenforschung der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin in Gatersleben und dem Institut für Genetik der Martin Luther-Universität Halle

## BEZIEHUNGEN ZWISCHEN DEM WURZELWACHSTUM UND DER SENSIBILITÄT DER WURZELMERISTEME GEGENÜBER VERSCHIEDENEN RADIOMIMETICA BEI *VICIA FABA*

Von

R. RIEGER und A. MICHAELIS

(Eingegangen am 10. November 1960)

### I. Einleitung

Unterschiede in der an der Anzahl induzierter Chromosomenaberrationen gemessenen Strahlensensibilität der verschiedenen Stadien des Mitose- und Meiosezyklus (KOLLER 1949, 1954, SPARROW, MOSES und STEELE 1952, REVELL 1953) bzw. der Keimzellentwicklung sind experimentell gut belegt (FRITZ-NIGGLI 1959, OSTER 1959). Sehr viel weniger Arbeiten liegen zur Frage der Strahlenempfindlichkeit verschiedener Organe und Zellsysteme des gleichen Organismus vor (SAX und SWANSON 1941). Im verstärkten Maße gilt diese Feststellung für das Sensibilitätsmuster nach Einwirkung chemischer Radiomimetica. Für eine ganze Reihe chemisch z. T. stark unterschiedener radiomimetischer Substanzen sind zwar ausgeprägte Sensibilitätsunterschiede im Zellzyklus — fast immer maximale Empfindlichkeit der Interphase —, in der Keimzellentwicklung von *Drosophila* (AUERBACH 1958, 1960, AUERBACH und SONBATI 1960) und darüber hinaus zwischen Eu- und Heterochromatin nachgewiesen worden, aber es gibt bei botanischen Objekten kaum experimentell belegte Befunde, die Aussagen über das Empfindlichkeitsspektrum verschiedener Organsysteme bzw. des gleichen Organsystems zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten zulassen. Der Zweck unserer Experimente mit drei verschiedenen Radiomimetica war, einen Beitrag zur Schließung dieser Lücke zu liefern.

Auf die jeweilige Sensibilität wurde in diesem Zusammenhang einmal das aktive Meristem unterschiedlich langer Hauptwurzeln von *Vicia faba* überprüft. Zum anderen wurden Empfindlichkeitsvergleiche zwischen dem Haupt- und Seitenwurzelmeristem angestellt. Maßstab der Empfindlichkeit war in allen Fällen das Ausmaß induzierter Chromosomenaberrationen.

Zur Einwirkung kamen die Radiomimetica Äthylalkohol, Myleran (Dimethansulfonyloxybutan) und Stickstofflost (Methyl-bis-( $\beta$ -chloräthyl)-amin-chlorhydrat). Die beiden letztgenannten Verbindungen



sind bifunktionelle alkylierende Substanzen, während die Fähigkeit des Äthylalkohols, bei *Vicia faba* Chromosomenaberrationen auszulösen, sicher nicht auf Alkylierungsvorgänge zurückzuführen ist (RIEGER und MICHAELIS 1960 a, b).

## II. Material und Methodik

Als Versuchsmaterial dienten Samen von *Vicia faba* var. *minuta*, Sorte „Dornburger Ackerbohne“ ( $2n=12$ ). Für die Behandlung unterschiedlich langer Hauptwurzeln wurden die Samen im belüfteten Exsikkator bei 24° C im Dunkeln auf feuchten Zellwattlagen angezogen. Für die Anzucht von Seitenwurzeln wurden Samen mit 2 cm langen Hauptwurzeln auf Erlenmeyerkolben mit Leitungswasser gesetzt und bei Raumtemperatur, Tageslicht und regelmäßigem Wasserwechsel 8–10 Tage aufgestellt. Während der Behandlungs- und Erholungszeit standen die Wurzeln im Dunkeln bei 24° C in Temperierbädern, die mit Hilfe von Höppler-Thermostaten auf  $\pm 0,2^\circ$  C konstant gehalten wurden.

Im Anschluß an die Erholungszeit (EZ) erfolgte Colchicinbehandlung (100 min, 0,05 %) zur Verkürzung der Chromosomen und Metaphaseanreicherung, Fixierung in Alkohol-Eisessig 3:1, Feulgen-Quetsch-Präparation und Verarbeitung über Trockeneis-Alkohol zu Euparal-Dauerpräparaten. Für jede Versuchsstufe wurden aus 3 Wurzelspitzen je 50 Metaphaseplatten ausgezählt und die Chromosomenaberrationen erfaßt. Die Versuche wurden einmal wiederholt, so daß insgesamt 300 Metaphaseplatten pro Versuchsstufe ausgewertet werden konnten. Als Maß für die Streuung der einzelnen Werte ist der mittlere Fehler errechnet und in den Tabellen angegeben worden.

Die Radiomimetica wurden in Sörensen-Phosphat-Puffer pH 7 (0,017 Mol) gelöst. Als Lösungshilfe für das in Wasser schwer lösliche Myleran dienten 2 % Aceton.

## III. Ergebnisse

### 1. Die Sensibilität der Meristeme unterschiedlich langer Hauptwurzeln

Äthylalkohol, Myleran und Stickstofflost kamen auf die Meristeme 2, 4, 6, 8 und 10 cm langer Hauptwurzeln von *Vicia faba* zur Einwirkung. Die verwendeten Konzentrationen der drei Agentien wurden so gewählt, daß nach entsprechender Einwirkungszeit etwa gleiche Prozentsätze von Zellen mit Chromosomenaberrationen auftraten, wenn 2 cm lange Primärwurzeln verglichen wurden. Bei Temperaturen von 24° C im Behandlungs- und Erholungszeitraum kamen 100 mMol Äthylalkohol, 0,5 mMol Myleran und 0,001 mMol Stickstofflost zur Anwendung. Die Einwirkungsdauer betrug für Äthylalkohol und Myleran 24 Std, für Stickstofflost 1 Std. Fixiert wurde jeweils nach 24 und 48 Std Erholungszeit. Zur Auswertung auf ihren Gehalt an Chromosomenaberrationen kamen Metaphasen. Alle drei Substanzen induzierten Aberrationen ausschließlich auf chromatidaler Basis (Abbildung der erfaßten Aberrationstypen in MICHAELIS und RIEGER 1958, 1960).

Das Sensibilitätsmuster der unterschiedlich langen Hauptwurzeln nach Einwirkung der Radiomimetica ist aus Tabelle 1 ersichtlich. Die Meristeme 2 und 4 cm langer Hauptwurzeln wiesen übereinstimmend

Tabelle 1. Die Sensibilität der Meristeme unterschiedlich langer Hauptwurzeln gegenüber den Radiomimetica Äthylalkohol, Myleran und Stickstofflost (HN 2) (Pro Versuch 300 Zellen ausgewertet; Erholungszeit 24 Std bei 24° C).

Agens	Konzentration	Einwirkungszeit	Wurzellänge	Metaphasen mit Aberrationen		B''	T'	Tri	DD	D	B'	Gesamt-aberrationen	Aberrationen pro	
													ausgewertete	„geschädigte“
				abs.	%								Zelle	
Äthylalkohol	100	24	2	143	47,7 ± 3,9	66	51	4	15	20	0	156	0,52	1,09
			4	142	47,3 ± 2,1	86	47	3	13	9	0	158	0,53	1,11
			6	64	21,3 ± 6,4	27	21	4	9	6	0	67	0,22	1,05
			8	22	7,3 ± 2,7	10	7	1	3	1	0	22	0,07	1,00
			10	7	2,3 ± 1,9	4	3	0	0	0	0	7	0,02	1,00
Myleran	0,5	24	2	137	45,7 ± 2,6	60	57	4	22	15	0	148	0,49	1,08
			4	136	45,3 ± 1,0	74	53	3	12	13	2	157	0,52	1,15
			6	147	49,0 ± 3,2	73	67	4	17	15	1	177	0,59	1,20
			8	109	36,3 ± 2,6	55	34	3	10	10	2	114	0,38	1,05
			10	72	24,0 ± 11,9	42	25	2	2	6	1	78	0,26	1,08
HN 2	0,001	1	2	132	44,0 ± 5,9	64	45	2	23	14	0	148	0,49	1,12
			4	133	44,3 ± 4,6	69	47	2	25	12	0	155	0,52	1,17
			6	138	46,0 ± 4,0	60	39	6	25	21	0	151	0,50	1,09
			8	143	47,7 ± 1,5	78	58	3	16	22	0	177	0,59	1,14
			10	36	12,0 ± 10,4	20	13	1	2	2	0	38	0,13	1,05

(B'' = Isolocusbruch; T' = reziproke Chromatidentranslokation; Tri = Triradial; DD = Duplikations-Deletion; D = Deletion; B' = Chromatidenbruch)

zwischen 40 und 50% Metaphasen mit Chromosomenaberrationen auf. Im Falle von 6 cm langen Hauptwurzeln traten Sensibilitätsunterschiede gegenüber dem Äthylalkohol einerseits und Myleran und Stickstofflost andererseits auf. Nach Behandlung mit Äthylalkohol wurden nur noch etwa halb so viele Metaphasen mit Chromosomenaberrationen gefunden wie in den Meristemen der 2 und 4 cm langen Wurzeln, während bei Verwendung von Myleran und Stickstofflost kein Absinken des Prozentsatzes erfolgte. Die Wirksamkeit des Äthylalkohols verringerte sich dann weiter mit der Verlängerung der Wurzel auf 8 und 10 cm und war im letzten Fall praktisch erloschen.

Nach Myleraneinwirkung begann der Anteil aberranter Metaphasen in den Meristemen 8 cm langer Wurzeln abzusinken und erreichte bei 10 cm etwa den halben Ausgangswert. Wurde Stickstofflost verwendet, hielt sich die Anzahl der Metaphasen mit Chromosomenaberrationen bis zu einer Wurzellänge von 8 cm praktisch konstant, um dann bei 10 cm langen Wurzeln auf etwa  $\frac{1}{4}$  des Ausgangswertes abzusinken. Gleichzeitig erhöhten sich nach Behandlung 10 cm langer Hauptwurzeln mit Myleran und Stickstofflost die Streuungswerte erheblich, d. h. die einzelnen Meristeme verhielten sich in ihrer Reaktion auf die Agentien nicht mehr so einheitlich wie bei den kürzeren Wurzeln. Aus Tabelle 1 ist

ersichtlich, daß alle Aberrationstypen etwa übereinstimmend reagierten und keiner präferentiell in seinem Anteil verändert wurde. Alle Versuche liefen in 2 Wiederholungen, die aber zusammengefaßt wurden, nachdem sich in der Auswertung ergeben hatte, daß keine signifikanten Unterschiede zwischen ihnen zu verzeichnen waren.

## 2. Sensibilität der Haupt- und Seitenwurzelmeristeme

Bezüglich der am Prozentsatz von Zellen mit Chromosomenaberrationen gemessenen Sensibilität der Haupt- und Seitenwurzelmeristeme zeigten sich nach Einwirkung von Myleran und Stickstofflost keine signifikanten Unterschiede. Der Prozentsatz aberranter Metaphasen in den Meristemen stimmte gut überein. Die Länge der Wurzeln betrug in diesem Fall zu Behandlungsbeginn etwa 2 cm (Tabelle 2).

Völlig andere Verhältnisse ergaben sich bei Einwirkung von 100 mM Äthylalkohol. Während mit dieser Konzentration im Hauptwurzelmeristem 44% aller ausgewerteten Zellen Chromosomenaberrationen aufwiesen, waren es im Seitenwurzelmeristem im Durchschnitt nur 5%. Eine Erhöhung der Konzentration auf 500 mM steigerte den Anteil aberranter Metaphasen in der Hauptwurzel auf 84% nach 24 Std Erholungszeit, während im Seitenwurzelmeristem keinerlei Zunahme des Prozentsatzes von Zellen mit Chromosomenaberrationen erfolgte. Kontrollfixierungen nach längerer Erholungszeit (48 Std) zeigten, daß keine Verschiebung im Aberrationsmaximum bei Anwendung der höheren Konzentration erfolgte. Ohne Zweifel ist die Sensibilität der Haupt- und Seitenwurzelmeristeme von *Vicia faba* gegenüber Äthylalkohol stark verschieden, bei Verwendung von Myleran und Stickstofflost dagegen identisch. Höhere Konzentrationen als 500 mM Äthylalkohol konnten nicht zur Anwendung gebracht werden, da die genannte Konzentration unmittelbar unter der Letalitätsdosis lag.

Eine Sensibilisierung des Seitenwurzelmeristems ließ sich über gesteigerte Temperaturen erreichen. Kamen 100 mM Äthylalkohol bei 30°C 24 Std lang auf Primärwurzeln zur Einwirkung, erhöhte sich der prozentuale Anteil von Metaphasen mit Chromosomenaberrationen nach 24 Std Erholungszeit bei 24°C von 44,0% auf 80,3%, d.h. eine Temperaturerhöhung um 6°C verdoppelt etwa die Effektivität des Äthylalkohols. Die gleiche Verfahrensweise führte beim Seitenwurzelmeristem zu einer noch viel stärkeren Sensibilisierung. Dieselbe Äthylalkohol-Konzentration erhöhte hier den prozentualen Anteil von Metaphasen mit Chromosomenaberrationen von 5,0% (24°C) auf 42,7% (30°C), ohne aber die Anzahl von Aberrationen pro „geschädigte“ Zelle in dem Ausmaß zu erhöhen wie im Hauptwurzelmeristem (1,09 gegenüber 1,64, Tabelle 2). Die Sensibilisierung drückte sich hier im wesentlichen

in der Anzahl von Metaphasen mit Chromosomenaberrationen aus, während die Zahl der Aberrationen pro Zelle mit einem Wert um 1 herum konstant blieb.

Erwartungsgemäß machten die Isolocusbrüche in allen Fällen den Hauptanteil an den Aberrationen aus, dicht gefolgt von den Chromatiden-translokationen. Außerordentlich selten wurden freie, d.h. nicht an Reunionen beteiligte Chromatidenbrüche und unvollständige Chromatiden-translokationen gefunden. Das empfindlichste Stadium des Zellzyklus gegenüber den drei getesteten Substanzen war übereinstimmend die Interphase (REVELL 1953, MICHAELIS und RIEGER 1960, RIEGER und MICHAELIS 1960), und zwar deren erste Hälfte. Die Aberrationen traten bevorzugt in den heterochromatischen Abschnitten der Chromosomen auf. Die Satellitenchromosomen waren nicht längenproportional an den Aberrationen beteiligt, sondern im Vergleich mit den kleinen Chromosomen des aus zwölf Einheiten bestehenden Chromosomensatzes von *Vicia faba* erheblich seltener als erwartet.

Chromosoma (Berl.), Bd. 11

Tabelle 2. Die Sensibilität der Haupt (H)- und Seitenwurzelmeristeme (S) gegenüber den Radiomimetica Äthylalkohol, Myleran und Stickstofflost (HN 2)  
(Pro Versuch 300 ausgewertete Zellen, Erholungszeit 24 Std bei 24° C; Symbole wie in Tabelle 1).

Agens	Meristem	Konzentration mMol	Einwirkungszeit Std	Temperatur °C	Metaphasen mit Aberrationen		B''	T'	Tri	DD	D	B'	Gesamt-aberrationen	Aberrationen pro Zelle	
					abs.	%								ausgewertete	"geschädigte"
Äthylalkohol	H	100	24	24	132	44,0 ± 7,8	75	56	1	10	5	1	148	0,49	1,12
	S	100	24	24	15	5,0 ± 3,0	13	2	0	0	0	0	15	0,05	1,00
Äthylalkohol	H	500	24	24	252	84,0 ± 4,0	163	119	12	31	35	0	360	1,20	1,43
	S	500	24	24	16	5,3 ± 1,6	15	1	0	0	0	0	16	0,05	1,00
Äthylalkohol	H	100	24	30	241	80,3 ± 7,1	165	153	5	35	34	3	395	1,32	1,64
	S	100	24	30	128	42,7 ± 6,9	59	56	3	14	8	0	140	0,47	1,09
Myleran	H	0,5	24	24	146	48,7 ± 4,1	63	47	3	24	19	0	156	0,52	1,07
	S	0,5	24	24	145	48,3 ± 1,9	78	48	1	19	12	1	159	0,53	1,10
HN 2	H	0,001	1	24	130	43,3 ± 2,3	69	39	4	27	11	0	150	0,50	1,15
	S	0,001	1	24	136	45,3 ± 8,2	89	54	3	11	11	1	169	0,56	1,24

#### IV. Diskussion

Das normale Wurzelwachstum der Hauptwurzel von *Vicia faba* ist unmittelbar nach der Keimung gering und steigert sich bis eine Länge von 6–10 cm erreicht wird. Anschließend bleibt der Zuwachs über etwa 5 Tage konstant, sinkt dann ab und beträgt etwa  $\frac{1}{2}$  des Maximalzuwachses bei Erreichen einer Länge von 30–35 cm (GRAY und SCHOLLES 1951 zit. nach READ 1959). Unsere Untersuchungen an den Hauptwurzeln betreffen also den Bereich maximaler Zuwachsraten der mit einer Wurzellänge von 6–10 cm sein Ende findet. Die Seitenwurzeln besitzen die gleiche Struktur wie die Hauptwurzeln und gehen aus einer Zelle des zwischen Cortex und Cambium gelegenen Perizykels hervor (READ 1959).

Die im experimentellen Teil aufgeführten Befunde weisen Sensibilitätsunterschiede des Hauptwurzelmeristems mit fortschreitender Wurzellänge nach, wobei zusätzlich noch unterschiedliche Reaktionen auf Äthylalkohol einerseits und Myleran und Stickstofflost andererseits erkennbar werden. Dem etwas unterschiedlichen Verhalten der Wurzeln auf die Einwirkung von Myleran und Stickstofflost soll hier keine besondere Bedeutung beigemessen werden, da im Falle von Stickstofflost auf Grund der kürzeren Einwirkungsdauer die Fixierungen 23 Std früher erfolgten als nach Myleranbehandlung. Es ist aus diesem Grunde nicht ausgeschlossen, daß echte Unterschiede nur vorgetäuscht werden und methodisch begründet sind. Völlig eindeutig ist, daß die Sensibilität der Hauptwurzelmeristeme nach Alkoholeinwirkung relativ schnell abnimmt und in 10 cm langen Wurzeln praktisch erloschen ist. Bei Verwendung der Alkylierungsmittel Myleran und Stickstofflost deutet sich ebenfalls eine, aber erheblich später eintretende und weniger ausgeprägte Sensibilitätsabnahme der Meristemzellen an.

In diesem Zusammenhang ergibt sich die Frage, ob es sich hierbei um echte, mit dem Wurzelwachstum in Beziehung stehende Sensibilitätsunterschiede der Zellen handelt oder ob solche nur dadurch vorgetäuscht werden, daß durch den experimentellen Eingriff Verschiebungen in der Mitosedauer bzw. im Mitose-„Rhythmus“ induziert werden. Diese Möglichkeit ließ sich durch Kontrollfixierungen ausschließen, die im experimentellen Teil nicht aufgeführt worden sind. Maximaverschiebungen wurden nicht aufgefunden. Außerdem ließ sich bei konstant bleibenden Maxima nach 24 Std Erholungszeit im Anschluß an die Einwirkung höherer Konzentrationen der Agentien genau die gleiche Reaktion der Meristeme erzielen. Die jeweiligen Aberrationsprozentsätze sanken nach derselben Regel, lagen aber auf einer entsprechend höheren Stufe.

Ein weiterer Einwand gegen echte Sensibilitätsunterschiede könnte in wachstumskorrelierten Permeabilitätsveränderungen gesehen werden.

Da Äthylalkohol ein passiv und sehr schnell permeierendes Agens darstellt, dürfte dieser Einwand hier gegenstandslos sein. Gleiches vermuten wir für Stickstofflost und Myleran, da beide in ihrer Effektivität unter anaeroben Verhältnissen bzw. unter dem Einfluß von Respirationsinhibitoren (FORD 1949, KIHLMAN 1955, MICHAELIS und RIEGER 1960) in ihrer radiomimetischen Wirksamkeit nicht beeinflußt werden.

Damit erscheint es gerechtfertigt, die experimentellen Ergebnisse auf echte, mit dem fortschreitenden Wurzelwachstum in Beziehung stehende Empfindlichkeitsunterschiede der Meristemzellen gegenüber den drei Radiomimetica zurückzuführen.

Alle beobachteten Aberrationen sind zweifellos das Ergebnis mehr oder weniger langer Ketten von Prozessen, die schließlich das Endergebnis — die chromosomale Strukturveränderung — herbeiführen. Sicherlich sind diese Reaktionsketten durch entsprechende physiologische Zustände der Zellen in Abhängigkeit vom jeweiligen radiomimetischen Agens mehr oder weniger leicht beeinflufßbar. Im Falle von Äthylalkohol sind eine Reihe von Beeinflussungsmöglichkeiten bekannt, zu denen u. a. die Temperatur, der Sauerstoffdruck und Respirationsinhibitoren, die auf den ATP-Spiegel der Zelle Einfluß nehmen, gehören (RIEGER und MICHAELIS 1960 a, b, 1961). An vorläufig noch nicht näher charakterisierbare physiologische Faktoren der Zelle und deren Veränderung im Verlaufe des Wurzelwachstums zu denken, erscheint somit zur Erklärung der differentiellen Sensibilität unterschiedlich langer Hauptwurzeln bzw. der Haupt- und Seitenwurzeln gegenüber Äthylalkohol gerechtfertigt.

Eine so zwangsløse Erklärung bietet sich für den Abfall der Wirksamkeit der beiden alkylierenden Substanzen im Falle 10 cm langer Hauptwurzeln nicht an, zumal hier Haupt- und Seitenwurzelmeristeme gleich sensibel reagierten. Wenn davon ausgegangen wird, daß die zu Chromosomenaberrationen führende Reaktionskette im Falle alkylierender Substanzen zwar beeinflufßbar (SWANSON und MERZ 1959), aber doch sehr viel unabhängiger vom stoffwechselphysiologischen Zustand der Zellen ist (FORD 1949, KIHLMAN 1955), muß festgestellt werden, daß die postulierten Veränderungen der Stoffwechselphysiologie des Hauptwurzelmeristems hier sehr viel geringeren und späteren Einfluß als bei Verwendung von Äthylalkohol nehmen und im Seitenwurzelmeristem zu einer Modifikation der radiomimetischen Wirkung von Myleran und Stickstofflost überhaupt nicht ausreichen.

Wir sind geneigt, die differentielle Sensibilität der Meristeme gegenüber der radiomimetischen Wirkung von Äthylalkohol mit stoffwechselphysiologischen Unterschieden zu erklären. Für Myleran und Stickstofflost vermuten wir das gleiche, sind uns aber der dieser Erklärung noch entgegenstehenden Schwierigkeiten bewußt. Solange nicht doch noch unterschiedliche Mechanismen für die verschiedenen Sensibilitäts-

muster nach Einwirkung der drei Agentien gefunden werden, kann als Arbeitshypothese gelten, daß Äthylalkohol, Myleran und Stickstofflost unterschiedlich drastisch auf den selbst gesetzmäßigen Veränderungen unterworfenen stoffwechselphysiologischen Zustand der Meristemzellen zur Zeit der Einwirkung reagieren. Diese unterschiedliche Reaktion erscheint insofern begründet, als die alkylierenden Substanzen Chromosomenaberrationen sicher über kürzere, direktere und schwerer beeinflußbare Wirkungswege auslösen als Äthylalkohol, der möglicherweise erst über mutagene, im Zellstoffwechsel entstehende Abkömmlinge zur Wirkung kommt.

### Summary

1. The sensitivity pattern of the *Vicia faba* main root meristem against the radiomimetic compounds ethanol, myleran and nitrogen-mustard was found to be dependent on root length. In the case of ethanol sensitivity, measured by the percentage of metaphases with chromosome aberrations, it was similar in 2 and 4 cm roots. Further enlargement of roots up to 10 cm length caused a drastic decrease in the number of damaged cells. This decrease was not so striking and happened later when myleran and HN 2 were used.

2. No sensitivity differences between 2 cm long main and lateral roots were found when treated with myleran or HN 2. Contrary to this the lateral rootlets showed practically no aberrations after treatment with ethanol, the percentage of damaged cells in the main root meristem being 44%.

3. Results are discussed in relation to the question whether these sensitivity differences are real or only spurious, e.g. caused by permeation phenomena or alterations in duration of mitosis. It is concluded, that changes in the sensitivity pattern are true and probably caused by metabolic changes in the meristem cells, correlated with growth of the root, and upon which the three radiomimetic compounds reacted differently because of different modes of action.

### Literatur

- AUERBACH, C.: Chemical mutagenesis in animals. In H. STUBBE (Herausgeb.), Chemische Mutagenese. Abh. Dsch. Akad. Wiss., Kl. Med. Nr 1, 1—13 (1960).  
—, and E. M. SONBATT: Sensitivity of the *Drosophila* testis to the mutagenic action of mustard gas. Z. Vererb.-Lehre 91, 237—252 (1960).  
FORD, C. E.: Chromosome breakage in nitrogen mustard treated *Vicia faba* root tip cells. Proc. VIII. Int. Congr. Genetics. Hereditas (Lund) Suppl., 570—571 (1948).  
FRITZ-NIGGLI, H.: Strahlenbiologie. Grundlagen und Ergebnisse. Stuttgart: Georg Thieme 1959, 379 S.  
GRAY, L. H., and M. E. SCHOLES: The effect of ionizing radiations on the broad bean root. VIII. Growth rate studies and histological analysis. Brit. J. Radiol. 24, 82—176 (1951).



- KIHLMAN, B. A.: Oxygen and the production of chromosome aberrations by chemicals and X-rays. *Hereditas* (Lund) **41**, 384—403 (1955).
- KOLLER, P. C.: The response of *Tradescantia* pollen grains to radiation at different dosage rates. *Brit. J. Radiol.* **19**, 393—404 (1946). — Chromosome breakage. *Progr. Biophysics* **4**, 195—243 (1954).
- MICHAELIS, A., u. R. RIEGER: Cytologische und stoffwechselpysiologische Untersuchungen am aktiven Meristem der Wurzelspitze von *Vicia faba* L. II. Präferentielle Verteilung der chromosomalen Bruch- und Reunionspunkte nach anaerober Quellung der Samen. *Chromosoma* (Berl.) **9**, 514—536 (1958). — Einige experimentelle Ergebnisse zur Wirkung von Myleran auf die Chromosomen von *Vicia faba*. *Züchter* **30**, 150—163 (1960).
- OSTER, I. I.: The spectrum of sensitivity of *Drosophila* germ cell stages to X irradiation. In J. H. MARTIN (edit.), *Radiation biology*, p. 253—265. London: Butterworth & Co. 1959.
- READ, I.: *Radiation biology of Vicia faba* in relation to the general problem. Oxford: Blackwell 1959, pp. 270.
- REVELL, S. H.: Chromosome breakage by X-rays and radiomimetic substances in *Vicia*. *Heredity* **6** (Suppl.), 107—124. (1953)
- RIEGER, R., u. A. MICHAELIS: Über die radiomimetische Wirkung von Äthylalkohol bei *Vicia faba*. In H. STUBBE (Herausgeb.), *Chemische Mutagenese*. Abh. dtsh. Akad. Wiss., Kl. Med., Nr 1, 54—65 (1960a). — Der Einfluß von Stoffwechselinhibitoren auf die radiomimetische Wirkung von Äthylalkohol. *Mber. dtsh. Akad. Wiss.* **2**, 290—297 (1960b). — Die Bedeutung von ATP für die radiomimetische Wirkung von Äthylalkohol bei *Vicia faba*. *Naturwissenschaften* (1961, im Druck).
- SAX, K., and C. P. SWANSON: Differential sensitivity of cells to X-rays. *Amer. J. Bot.* **28**, 52—59 (1941).
- SPARROW, A. H., M. J. MOSES and R. STEELE: A cytological and cytochemical approach to an understanding of radiation damage in dividing cells. *Brit. J. Radiol.* **25**, 182—189 (1952).
- SWANSON, C. P., and T. MERZ: Factors influencing the effect of  $\beta$ -propiolactone on chromosomes of *Vicia faba*. *Science* **129**, 1364—1365 (1959).

Dr. R. RIEGER, Dr. A. MICHAELIS,  
Institut für Kulturpflanzenforschung, Gatersleben,  
Krs. Aschersleben

## Register

Zusammengestellt von Dr. ROLAND DIETZ, Wilhelmshaven

(Seitenzahlen in Fettdruck bei Autorennamen verweisen auf die Originalarbeiten)

- ABEL, W. O. **322—334** (Mutagene Wirkung von Maleinsäurehydrazid an *Sphaerocarpus*)
- ABELE, K. 474
- Ablaptus amazonus* 105, 121, 125
- —, Meiose in den Harlekinschläuchen 117—119
- Acanthocyclops robustus* 420
- —, Chromosomenzahl 425
- —, Oogenese 425, 426
- —, Spermatogenese 426
- *vernalis* 420, 425, 430, 431
- —, Chromosomenzahl 426
- —, Oocytenteilungen 426, 427
- —, Spermatocytenteilungen 427
- Achillea asplenifolia* 523, 526—530, 538, 544, 549, 550
- *collina* 525, 526, 528, 549
- *crithmifolia* 526, 544, 549
- *miliefolium*-Komplex, überzählige Chromosomen 523—550
- *roseo-alba* 526, 527, 549
- *setacea* 525—529, 538, 544
- Acrididae* 2
- Acrosternum* 255
- Actidion und Mitoserate 317—319
- ACTON, A. B. 265
- Aenoplex* 508
- Äther 191
- Äthylalkohol, mutagene Wirkung auf Wurzelspitzen von *Vicia* 573—576, 578—580
- Agacitus dromedarius* 105, 125
- —, Meioseablauf in den Harlekinschläuchen 113—115
- Agrostis* 545
- AKDIK 448
- ALAM, Z. 219, 223
- Alitocoris parvus* 105
- —, Meioseablauf in den Harlekinschläuchen 111, 123, 124
- *schraderi* 105
- —, Meioseablauf in den Harlekinschläuchen 110, 111, 123, 124
- ALLGAYER, H. 206
- Allium* 12, 191, 330, 479, 480, 482, 543, 545, 546
- Allozyklie 3, 490, 495, 496, 543
- ALMEDIA, DE J. C. 514
- AMMA, K. 419
- Amoeba* 313
- Anaphase 371
- bei *Bromus tritii*  $\times$  *B. carinatus* 168 bis 171, 194, 195
- bei *Lumbricillus* (triploid parthenogenetischer Cytotyp) 366—378
- bei Orthocladiniinen 387
- von Univalenten 196, 366—378, 387
- ANDERSON, E. 459, 460
- Anisolabis* 191, 193, 196
- ANSLEY, H. R. 122, 125, 247
- Aphrodes* 254, 260
- Apotettix* 433
- Apterona* 94—96, 375
- Architas pudens* 105
- —, Meioseablauf in den Harlekinschläuchen 115, 116, 125
- ARMSTRONG, J. M. 302
- Artefakte 514—522
- Arvelius* 125
- Asphondylia* 415
- Asphondyliini* 415
- ASTAUROV, B. L. 82
- Asteroides* 291
- Asynapsis s. Paarungsausfall
- Auchenorrhyncha*, Chiasmata 258, 259
- , DNS-Photometrie 254—256, 259 bis 261
- , Meiose 245—254, 256—261
- AUERBACH, C. 573
- Automixis 30, 31, 47, 54—63, 66
- Autoradiographie 553—570
- Aves* 484—498
- Bacteria* 313
- BAHR, G. F. 267, 357
- BAJER, A. 169, 196, 197, 200, 208

- Balbiani-Ring 267, 342  
*Banasa* 260  
 BARNUM, C. P. 553, 564  
 BARR, M. L. 496  
 BATESON, W. 433  
 BAUER, H. 263, 265, 357, 358, 361, 380, 381, 395, 397—399  
 BAWA, S. R. 257  
 BAYREUTHER, K. 361  
 BEADLE, G. W. 131, 191, 192, 376  
 BEATTY, R. A. 521  
 BECK, S. 514  
 BECKER, H. J. 129, 139, 141, 342  
 BEERMANN, S. 430  
 BEERMANN, W. 129, 143, 263—296 (Nucleolus als lebenswichtiger Bestandteil des Zellkerns), 342, 357, 380, 381, 397—399, 419, 430  
 Befruchtung, gerichtete 461  
 BEIRNE, B. P. 246  
 BĚLAŘ, K. 13  
*Bellavalia* 12  
 BERG, K. H. VON 306  
 BERGER, C. A. 543, 558, 566  
 BERRY, R. O. 146, 506  
 BERTRAM, E. Y. 496  
 BESSERER, S. 360  
 BIER, K. 257, 335—364 (Nährzellkernchromosomen von *Calliphora erythrocephala*)  
 BISHOP, P. M. L. 514  
 Bivalentstruktur bei auchenorrhynchen Homopteren 245—262  
 BJÖRKMANN, S. O. 545  
 BLACKWOOD, M. 546—548  
 Blockheterochromatin 342  
 BLOOM, W. 507  
 BÖCHERT, T. W. 546  
 BÖÖK, J. A. 192  
*Bombyx* 82  
 BORING, A. M. 247  
 BORSTEL, H. C. VON 129, 288  
 BORYSKO, E. 357  
*Bos* 191  
 BOSEMARK, N. O. 545—548  
 BOUHARMONT, J. 445, 450  
 BOWEN, R. H. 104, 106, 122, 314  
*Brachystethus rubromaculatus* 105, 123, 127  
 — —, Meiose in den Harlekinschläuchen 121, 122  
 BRANT, J. W. A. 484, 490, 494, 495  
*Brassica-Bastarde*, Pachytänalanalyse 214—218  
 — — *campestris*, Pachytänalanalyse 210—228  
 — — *nigra*, Pachytänalanalyse 208, 213 bis 228  
 — — *oleracea*, Pachytänalanalyse 208, 211 bis 228  
 BRAUER, I. 474  
 BRAUN, H. 419, 420, 424, 427, 429—431  
 BRENNER, S. 290, 295  
 BREUER, M. E. 129  
 BREUER, M. F. 346  
 BRIGGS, J. H. 514  
 BRINK, J. M. VAN 484, 487, 494, 495  
 BRITO DA CUNHA, A. 490  
 BROCK, R. D. 10, 433, 436  
*Bromus tritici* × *B. carinatus* 167—204  
 — — × — —, Verteilung und relative Dauer der meiotischen Stadien 168—171, 194, 195  
 BROWN, M. S. 543  
 BRYDEN, W. 433  
 BUCHNER, E. 322, 323  
 BÜNNING, E. 474, 475  
*Cairina* × *Anas* 191  
 CALLAN, H. G. 433, 436, 437, 440  
*Calliglypona* 259  
*Calliphora* 257  
 — — *erythrocephala*, Chromosomensatz 336  
 — —, Nährzellenchromosomen 335—364  
 — —, primäre Polytänchromosomen 337—339  
 — —, sekundäre Polytänchromosomen 339—355  
*Caltha* 545, 546  
 CAMERON, G. R. 543, 545, 546  
 CAMPBELL, A. 313  
*Camptochironomus* 264  
*Carex* 224  
 CARNIEL, K. 456—462 (Sterilitäts- und Befruchtungsproblem von *Rhoeo*)  
 CASPERSSON, T. 289, 313  
 CATCHESIDE, D. G. 15, 206, 219, 223, 224, 543, 546, 547  
 CAUDERON, Y. 306  
*Cecidomyiidae* 380  
 — —, Evolution des Chromosomenzyklus 414—416  
 — —, Spermatogenese 499—513

- Cecidomyiinae* 402, 415, 416  
*Cecidomyiini* 415  
*Centaurea* 543, 546  
 Centriol 371, 373, 374, 377, 378, 503, 507, 508  
 —, asynchrone Teilung 191—193, 197  
 Centromer s. Kinetochor, Neo-Centromerenaktivität  
 Centrosomen 193  
*Ceratochloa* 167  
 CHAYEN, J. 25, 27, 28  
 Chiasmata 10—17  
 —, Frequenz bei *Endymion* 433—440  
 — bei Homopteren 249, 258, 259  
 —, Terminalisation 490  
 —, Verteilung 441—455  
 CHIN, T. C. 302, 306  
*Chironomidae* 264, 380—401  
*Chironomus* 291  
 — *pallidivittatus*, Nucleolus 263—296  
 — *tentans*, Nucleolus 263—296  
 — × *C. pallidivittatus* 269—296  
 Chloralhydrat 191  
*Chorthippus* 10, 13, 16  
 — *brunneus*, Chromosomenanomalien in einer Wildpopulation 1—20  
 CHRISTENSEN, B. 365—379 (Reproductive cycle of an amphimictic diploid and parthenogenetic triploid *Lumbricillus*)  
 Chromatiden, Brüche 577  
 — Brücken 4—7, 10—13  
 — Rekombinationen 4—16, 229—235, 577  
 — Translokationen 577  
 Chromomeren 495  
 Chromosomen (s. a. Geschlechts-, Pachytän-, Polytän-, Riesen-, Interphase-, Mikro-, Keimbahnchromosomen)  
 B-Chromosomen s. Chromosomen, überzählige  
 E-Chromosomen s. Keimbahnchromosomen  
 k-Chromosomen s. Keimbahnchromosomen  
 s-Chromosomen s. Keimbahnchromosomen  
 Chromosomen-Aggregate 390, 397, 398  
 —, akzessorische s. -überzählige  
 — Anomalien in Wildpopulationen von *Chorthippus* 1—20  
 — Assoziationen 41, 382, 383, 390, 398  
 Chromosomen-Aggregate, Ausstoßung aus dem Prophasekern bei *Rhabdophaga* 501—503, 505, 506  
 — Bewegung, atypische, bei *Bromus tritici* × *B. carinatus* 169, 172, 173, 191—204  
 — — bei *Lumbricillus* 365—378  
 — — in monopolaren Spindeln 508—510  
 — — bei *Pentatomidae* (Harlekinschläuche) 108—127  
 — — bei *Rhabdophaga* 501, 505 bis 512  
 — Brüche s. Fragmentation  
 — Brücken bei *Chorthippus* (Wildpopulation) 4—7, 10—13  
 — — bei *Trillium* 229—244  
 — Duplikation 14—16, 153, 155  
 — Elimination 380, 386, 397, 398, 402, 416  
 — — bei *Mycophila* 405—409, 412, 413  
 — — bei *Sciara* 146—149, 157, 158, 165  
 —, Färbbarkeit nach DNase-Behandlung 479—483  
 — Fragmentation 4—7, 10, 15, 16, 229—244, 346, 448, 449  
 —, holokinetische 247  
 —, Hypotonie-Effekt 484, 485  
 — Morphologie und Präparationstechnik 514—522  
 — Mutationen (s. a. Brüche, Brücken, Chromatidenbrüche, Chromatidenbrücken, Chromatiden-Translokationen, Duplikation, Inversion, Translokation)  
 — — Sensibilität gegenüber mutagenen Substanzen 573—580  
 — Paarung (s. a. Sekundärpaarung) 221, 222, 376  
 — — in Polytänchromosomen 337, 340, 344, 353—355, 359, 360  
 — —, Ausfall 110—123  
 — —, — bei *Chorthippus* 8, 9  
 — —, — bei Copepoden 426, 429  
 — —, — bei *Lumbricillus* 368—371, 375—377  
 — —, — bei *Mycophila* 412  
 — —, — bei Orthocladini 382, 387, 390, 398  
 — —, — bei *Rhabdophaga* 501, 506, 509  
 — Reduplikation (s. a. DNS-Synthese) 14, 15

- Chromosomen-Spindel 384, 385  
 — Spiralisation 256—258  
 — Streckung 8, 359, 360  
 —, überzählige 90—94, 484, 523—550  
 — Verdoppelung (s. a. DNS-Synthese) 14, 15  
 — Verklumpung in der Harlekinmeiose 110—122, 124  
 — Volumen, Variation bei *Kleinia* 21—24  
 — Zahl s. Zahl der Chromosomen  
 CHU, E. H. Y. 514, 521  
*Cicadellidae* 245—261  
*Cicadellinae* 246, 261  
*Cicadula* 258  
*Clarkia* 543, 544  
 CLELAND, R. E. 545, 546  
*Coccidae* 260  
*Coffea* 445  
 — *arabica*, — *canephora*, — *congensis*, — *dewevrei*, — *dybowskii*, — *excelsa* s. *C. dewevrei*, — *kapakata*, — *liberica*, *robusta* s. *C. canephora*, — *ugandae*, Chiasmatafrequenz 451  
 Colchicin, Markierung sich synchron teilender Zellen 313—321  
 COLON, A. 313—321 (VAN'T HOF, WILSON and C.: Control of mitotic activity)  
 COOPER, K. W. 126, 292, 342, 359  
 CORLETTE, S. L. 344, 361, 563  
 CREIGHTON, 263, 264  
*Crepis* 376, 543, 545, 546  
 CREW, F. A. E. 191, 433  
 Crossing over s. Chiasmata  
*Crotalaria intermedia* 441, 442, 445  
 —, Chiasmatafrequenz 450, 452—454  
 CROUSE, H. V. 10, 146—166 (Influence of X-translocations on sex in *Sciara*), 235  
*Culex* 558, 566  
 CUNN, A. 301  
*Curculionidae* 375  
*Cyclops*, 419, 430  
*Cypripedium debile*, differentielle Färbbarkeit der Metaphasechromosomen 479—483  
 CZEKA, G. 21—24 (Größenunterschiede der Chromosomen von *Kleinia*)  
 DARLINGTON, C. D. 3, 10, 12, 13, 15—17, 196, 197, 223, 297, 298, 302, 311, 359, 360, 433, 434, 436, 456, 523, 545—548  
 DAS, N. K. 553—572 (PATAU and D.: Relation of DNA synthesis and mitosis in tobacco pith tissue)  
 DAVIDSON, D. 10  
 DAVIES, D. R. 306  
 DAVIES, H. G. 25, 27, 28  
 DEELËY, E. M. 25, 27, 28  
 DELAMATER, E. D. 313  
*Dendrocoelum* 433, 436—439  
 Desynapsis s. Chromosomenpaarung, Ausfall  
*Didelphis* 492  
 Differentialmitose 380, 386, 397, 398  
*Digitalis* 224  
 Dimethansulfonyloxybutan s. Myleran  
 Dinitrophenol 319  
*Dinocoris rufitarsus* 105, 106  
 —, Meiose in den Harlekinschläuchen 115  
*Diptera* 264, 380—401, 416  
*Discocephalini* 104—106, 113—119  
 Distanzkonjugation 421, 425, 426, 429  
 DNase, Behandlung von Metaphasechromosomen 479—483  
 DNS-Konstanz 562, 563  
 — — Photometrie bei *Auchenorrhyncha* 254—256, 259—261  
 — — bei *Cicadellidae* 254—256, 259 bis 261  
 — — Synthese und Mitose 553—571  
 — und Zellgröße 125  
 DOBZHANSKY, TH. 165, 376  
 DOLEZAL-JANISCH, R. 21, 27  
 DONNELLY, A. J. 514  
*Dorycephalinae* 261  
*Drosophila* 95, 126, 191, 251, 288, 292, 293, 337, 376, 377, 548, 563, 573  
 — *busckii*, Puffmuster der Speicheldrüsenchromosomen nach Transplantation 129—145  
 — *melanogaster* 130  
 Druck, hydrostatischer 191  
 DUNBAR, R. W. 361  
 DUNCAN, R. E. 197  
 DUNN, L. C. 433  
 EBERLE, P. C. 208  
*Ectocyclops* 419, 430  
*Edessini* 117, 121

D'AMATO, F. 569

DAN, K. 313

Daphne 191

- EGAMI, N. 419, 431  
 EHRENBURG, L. 191  
 EHRENDORFER, F. 523—551 (Akzessorische Chromosomen bei *Achillea*)  
 Einschnürung, primäre s. Kinetochor  
 Elimination s. Chromosomenelimination,  
 DNS-Elimination  
 ELSDALE, T. R. 288  
 EMERSON, R. A. 433  
 EMSWELLER, S. L. 544  
*Enchytraeidae* 365—379  
 Endomitose bei *Calliphora* 337, 338  
*Endymion nonscriptus*, Chiasmefrequenz  
 433—440  
 EPHRUSSI, B. 131  
 EITZ, S. Chromatiden-, Chromosomen-  
 brüche  
 ESSAD, S. 306  
 Euchromatin 208, 211, 225, 322, 325—328,  
 330, 331, 482  
*Eucyclops* 430  
 — *serrulatus* 420, 430  
 — —, Chromosomenzahl 428  
 — —, Oocytenteilungen 428—430  
 — —, Spermatocytenteilungen 429  
*Eupelicinae* 246, 261  
*Eupelzix cuspidata*, 246—249, 251—254,  
 258, 260  
 EVANS, H. J. 314  
 EYSTER, W. H. 433
- Färbbarkeit, differentielle nach DNase-  
 Behandlung 479—483  
 FANKHAUSER, G. 191, 193, 200, 416  
 FELT, E. P. 402, 500  
 FENZL, E. 21, 27  
 FERNANDES, A. 543, 545  
*Festuca* 544, 546, 548  
 FICQ, A. 563  
 FIRKET, H. 565  
 FISCHBERG, M. 288  
 FISHER, R. A. 465  
 FOGWILL, M. 433, 436, 437, 449  
 FORD, C. E. 330, 514, 521, 579  
 FRANKEL, O. H. 14, 16, 200  
 FREED, J. J. 337  
 FREESE, E. 10  
 FRIESNER, R., 474, 475  
*Fritillaria* 433, 434, 436, 438, 439, 543  
 FRITZ-NIGGLI, H. 573  
 FRÖST, S. 543, 545, 546
- FROLOWA, S. L. 82  
 FROST, H. B. 544  
 FUKUSHIMA, E. 191  
*Fulgorina* 259
- GALL, J. G. 360  
*Gallus domesticus*, Chromosomensatz  
 484—498  
 GARKE, L. 440  
*Gasteria* 12, 13, 16  
 GAUL, H. 454  
 GAULDEN, M. E. 288  
 GAUTIER, M. M. 514  
 GAY, H. M. 357  
 GEITLER, L. 21, 23, 245, 339, 563, 569  
 GERASSIMOVA-NAVASHINA, H. 200  
 Geschlechtsbestimmung, phänotypische  
 bei Copepoden 419  
 Geschlechtschromosomen bei Copepoden  
 421  
 — bei *Gallus domesticus* 490  
 — bei *Sciara* 146—166  
 — bei *Solenobia triquetrella* 44—55, 95, 96  
 GESSNER, B. 31  
 GEYER-DUSZYNSKA, I. 499—513 (Chro-  
 mosome behavior in spermatogenesis  
 of *Cecidomyiidae*)  
 GFELLER, F. 298  
 GILES, H. 514, 521  
 GILLES, A. 297, 302, 306, 307  
 GILLET, C. 322  
*Godetia* 543  
 GOTTSCHALK, W. 207—209, 223—225  
 GOULDEN, C. H. 298  
 GOWEN, J. M. 548  
 GRAFL, I. 21  
*Gramineae* 548  
*Graphocephala coccinea* 245—247, 253  
 — —, Chromosomenzahl 253  
 — —, DNS-Photometrie 254—256,  
 259—261  
 GRAY, L. H. 578  
 GRELL, M. 558, 566  
 GRÖBER, K. 224  
 GRUN, P. 545, 546  
 Gynander bei *Solenobia* 70, 71, 73
- Hadrobracon* 129  
 HADDER, J. C. 314, 317  
 HACKER, V. 420, 421

- HAGA, T. 223, 224  
 HAGBERG, A. 221, 222  
 HAGEMANN, R. 474, 475  
 HÅKANSSON, A. 545—547  
 HALDANE, J. B. S. 433  
 HALKKA, O. 245—262 (Structure of bivalents in *Auchenorrhyncha*)  
*Halysini* 104, 105, 108—113, 119  
 HAMMERTON, J. L. 514, 521  
 HANCE, R. T. 489, 494  
 Haploidie 404  
 HAQUE, A. 491  
 HARLING, G. 543  
 HARTE, C. 453, 463—478 (H. und ZINN-ECKER-BRAUER: Variabilität der Mitosehäufigkeit bei *Vicia faba*)  
 HARVEY, E. B. 377  
 HASITSCHKA, G. 21  
 HAUSCHKA, T. S. 496  
 HAUSCHTEK, E. 404, 414, 415  
 HEBERER, B. 424  
*Hecalinæ* 261  
 HEILBORN, O. 224  
 HEILBRUNN, L. V. 313  
 HEITZ, E. 191, 193, 263, 339, 342, 480  
 HENDERSON, S. A. 1—20 (JOHN, LEWIS and H.: Chromosome abnormalities in *Chorthippus*)  
 Heterochromatin (s. a. Heteropyknose) 322, 325—328, 330, 331, 342  
 — und DNS-Synthese 563  
 — und Färbbarkeit nach DNase-Behandlung 479—483  
 — und Genwirkung 332  
 — in den Pachytänchromosomen von *Brassica* 208—214, 225  
 — in den Polytänchromosomen von *Calliphora* 338—362  
 —, Sensibilität gegenüber mutagenen Substanzen 577  
 — und Sub-Chromatideffekte 12  
 Heterogamete und Allocydie 490, 492, 495, 496  
 —, weibliche bei Copepoden 419—432  
 —, — bei *Gallus domesticus* 494  
*Heteropeza* 402—405, 413—415  
*Heteropezinae* 402, 404  
*Heteropezini* 403, 415  
*Heteroptera* 103—127  
 Heteropyknose 113—123, 125, 126, 391, 405—408, 412, 485, 494—496  
 HILL, H. D. 302, 303, 306  
 HILPERT, G. 297, 306  
 HOARE, G. 434  
 HOFFMANN, I. 331  
 HOLLANDER 496  
 HOLZER, K. 21, 27  
*Homo* 191, 192  
*Homoptera* s. *Auchenorrhyncha*, *Sternorrhyncha*  
 HSU, T. C. 514, 521  
 HUGHES, A. 292, 293  
 HUGHES-SCHRADER, S. 245, 255, 256, 260, 360, 506, 508, 509  
 HUNGERFORD, D. A. 514  
 HUNTER-SZYBALSKA, E. M. 313  
 HUSKINS, C. L. 570  
 HUTCHINSON, C. B. 433  
*Hymenoptera* 95  
 HYPPIO, P. A. 314  
 Indolylessigsäure 553, 554, 562, 565, 567, 570  
 Interphasechromosomen, Sensibilität gegenüber mutagenen Substanzen 577  
 Inversion in Wildpopulationen von *Chorthippus* 14—16  
 ISHIZAKI, H. 496  
 Iso-Chromatid-Rekombination 229—244  
 Isopyknose 490  
 JAKOB, J. 337  
 JACOBS, P. A. 514, 521  
 JÄHNEL, G. 21  
 JAIN, H. K. 291, 310—312 (Induced neocentric activity in chromosome ends)  
 JAMES, E. T. W. 313  
 JARDETSKY, C. D. 553, 564  
 JOHN, B. 1—20 (J., LEWIS and HENDERSON: Chromosome abnormalities in *Chorthippus*)  
 JONES, D. F. 544  
 JONES, K. W. 303, 304, 306, 514  
 Kältebehandlung 191  
 KAHLE, W. 402  
 KAPLAN, W. D. 484, 485, 492  
 KARSTEN, G. 474, 475  
 KAUFMANN, B. P. 292  
 KAYANO, H. 545, 546  
 KEFALLINOU, M. 12, 16  
 Keimbahnchromosomen 380—402, 404



- KELLICOTT, W. 474  
 Kernvolumen und DNS-Gehalt 256  
 KEUNEKE, W. 336, 349  
 KEYL, H. G. 357, 361  
 KILMANN, B. 322, 330, 579  
 Kinetin 553, 554, 562, 565, 567  
 Kinetochor 12, 16, 193, 197, 200, 247,  
 311, 338, 342, 346, 348, 351, 352, 361,  
 362, 387  
 — und Centriol 507, 508, 510, 511  
 KINOSITA, R. 484, 485, 492  
 KIRKALDY, G. W. 105  
 KLEINFELD, R. 42  
*Kleinia spinulosa*, Größenunterschiede  
 der Chromosomen 21—24  
 KLINGSTEDT, H. 8, 10  
 KNAPP, E. 322, 330, 331  
 KNUDSEN, O. 191, 192  
 KOLLER, P. Ch. 10, 191, 433, 573  
 KOMOTO, Y. 201  
 KOONZ, C. H. 508  
 KOPAC, M. J. 130  
 KOSIN, I. L. 496  
 KOSTOFF, D. 302  
 KRACZKIEWICZ, Z. 402, 415, 499, 506  
 Krebs s. Tumor  
 KRIVSHENKO, J. 133, 292, 293  
 KROEGER, H. 129—145 (Induction of  
 new puffing patterns by transplanta-  
 tion of salivary gland nuclei into egg  
 cytoplasm of *Drosophila*)  
 KROHN, H. 278  
 KÜHN, A. 360  
 KUNZE, E. 355  
 KURABAYASHI, M. 241  
 KURITA, M. 480  
 KWAN, C. C. 206  
  
 La Cour, L. F. 10—12, 25—28, 433, 434,  
 436, 548  
 LAIRD, A. K. 553, 564  
 LAMM, R. 453  
*Lasioplera* 415, 506  
*Lasiopterini* 415  
 LAUBER, H. 21  
 LAWRENCE, W. J. C. 223  
 LEA, D. E. 15, 229  
*Ledrinae* 246, 261  
 LEIN, A. 306  
 LEJEUNE, J. 514  
 LELIVELD, J. A. 445, 451  
*Lepidoptera* 29—103  
  
 LERNER, I. M. 17  
 LESLEY, J. W. 544  
 LESLEY, M. M. 544  
*Lestodiplosis* 358  
*Lestremiinae* 402, 415, 416  
 Letalfaktoren bei *Chironomus*-Bastarden  
 277, 278  
 LETTRÉ, R. 292, 293  
 LEUCHTENBERGER, C. 125, 246  
 LEVAN, A. 480, 514, 521  
 LEWIS, A. C. 474  
 LEWIS, H. 544  
 LEWIS, K. R. 1—20 (JOHN, L. and HEN-  
 DERSON: Chromosome abnormalities  
 in *Chorthippus*)  
 LI, H. W. 306  
*Lilium* 10, 433, 434, 436—439, 546  
 LIMA-DE-FARIA, A., 208, 257, 348, 361,  
 545—547, 556  
*Limnodrilus* 376  
*Limnophyes biverticillatus* 381, 398  
 — —, Chromosomenzahl 382  
 — —, Oogenese 382—385  
 — *virgo* 381, 397—399  
 — —, Chromosomenzahl 385  
 — —, Oogenese 385—388  
*Limotettix* 259  
 LIN, M. 263, 291, 292  
 LINNERT, G. 208, 209, 224  
 LINTNER 146  
*Lolium* 291  
 — *perenne*, Neo-Centromerenaktivität  
 310—312  
 LONGLEY, A. E. 545  
 LORBEER, G. 322, 325, 331, 332, 543  
*Loxa* 125  
 — *flavicollis* 105, 123, 125  
 — —, Harlekinmeiose 122, 123  
 — *florida* 104, 105, 123  
 — —, Harlekinmeiose 122, 123  
 — *picticornis* 105, 123  
 — —, Harlekinmeiose 122, 123  
*Lucilia caesar*, Polytänchromosomen 336,  
 338, 355—357, 363  
*Luffia* 95, 96  
*Lumbricidae* 376  
*Lumbricillus lineatus* (diploide, amphi-  
 miktische und triploide, partheno-  
 genetische Form) 365—378  
 — —, Chromosomenzahlen 366, 368  
 — —, Oogenese 366—378  
*Lycopersicum* 543

- McCLINTOCK, B. 191, 192, 263, 264, 291, 292, 545
- McCOLLUM, G. D. 297, 302, 303, 306
- McCOY, T. A. 515
- McLEISH, J. 10, 322, 330, 331
- McMAHON, J. B. 191
- Macrocylops* 430
- *fuscus* 420, 430
- —, Chromosomenzahl 427
- —, Oocytenteilungen 427, 428
- —, Spermatocytenteilungen 428
- Macropygium reticulare* 105, 106, 111, 124
- MAKINO, S. 514, 521
- Makrochromosomen 209
- Maleinsäurehydrazid, mutagene Wirkung 322—334
- , teilungshemmende Wirkung 330
- MALINOWSKI, E. 206
- MARTIN, B. 110, 111
- MATHER, K. 17, 302, 453, 465
- MATSCHEK, H. 419, 424, 427, 431
- MATTHEY, H. 494, 495
- Matthiola* 543
- MATUSZEWSKI, B. 416
- Mayrinia variegata* 105
- —, Harlekinmeiose 122, 123
- MAZIA, D. 313
- MECHELKE, F. 129, 357
- Mecistorhinus* 125
- *melanoleucus* 105, 115, 116
- *panamensis* 105, 123, 125
- —, Harlekinmeiose 115—117
- *sepulchralis* 105, 123, 125
- —, Harlekinmeiose 115—117
- *tripterus* 105, 123, 125
- —, Harlekinmeiose 115—117
- MEDINA, D. M. 445, 451
- Megacyclops viridis* 420, 425, 426, 430
- —, Chromosomenzahl 420
- —, Oogenese 420—425
- —, Spermatogenese 424
- Meiose bei *Bromus-Bastarden* (*B. trinii* × *B. carinatus*) 168—171, 194, 195
- — — Chromosomenbewegung 169, 172, 191—204
- — — mehrkernige 181, 183, 185, 190, 199
- — — multipolare Spindelapparate 173—181, 185, 190—192, 198
- bei Copepoden 419—432
- Meiose bei *Endymion*, Chiasmefrequenz 433—440
- bei *Gallus* 489—497
- bei *Lumbricillus*, diploide Form, 366—368
- — —, triploide Form 368—378
- bei *Mycophila* (paedogenetische ♀♀) 405
- — — (sexuelle ♀♀) 409—411, 414
- — —, Spermatogenese 412, 414
- bei parthenogenetischen Orthocladiiinen 380—401
- — — —, Stadiendauer 382
- bei *Pentatomidae* (Harlekenschläuche) 106—127
- bei *Rhoeo discolor* 456—462
- bei *Solenobia triquetrella* 41—55
- — — —, Stadiendauer 65—66
- bei *Xerophloea viridis* 247—261
- MELANDER, Y. 546, 547
- Melandrium* 191
- Melanodermus tartarius* 105
- —, Harlekinmeiose 113
- Melanoplus* 563
- MELETTI, P. 27
- MENDES, C. H. T. 445, 451
- Mentha* 191
- MERZ, T. 579
- Metacyclops* 425
- Metaphase 366
- relative Dauer bei *Bromus-Bastarden* 168—171, 194, 195
- METHA, R. K. 297
- Methyl-bis-( $\beta$ -Chloräthyl)-amin-chlorhydrat s. Stickstofflost
- METZ, C. W. 146, 164, 377, 509, 510
- METZLER, S. 419, 423, 424, 430
- Miastor* 402, 403, 405, 406, 413, 415, 416, 506
- Miastorini* 403, 415
- MICHAELIS, A. 573—581 (RIEGER und M.: Wurzelwachstum und Sensibilität gegenüber Radiomimetica bei *Vicia faba*)
- Micromalthus* 509—512
- Micromyiini* 402, 415
- Mikrochromosomen bei *Gallus domesticus* 484—498
- Mikrosporocytenteilungen bei *Bromus-Bastarden* 167—204
- MILLER, O. J. 514
- MILLER, R. A. 484, 487, 492, 494

- Mitose und DNS-Synthese 553—571  
 — und Nucleolus 288, 289  
 — Rate bei *Pisum sativum* 316, 317  
 — — bei *Vicia faba*, Variabilität 463—478  
 — — — — —, Tagesrhythmus 467, 468, 473—476
- MITRA, S. 10, 229, 235  
 MITWOCH, U. 514  
 MIZUSHIMA, U. 221, 222  
 MÖLLER, E. 331  
 MOLÉ-BAJER, J. 169, 196, 200  
*Mollusca* 103  
*Monarthropalpus* 413, 415, 499, 506  
*Moncus obscurus* 105  
 — —, Harlekinmeiose 111—113, 123  
 Monogenie, Kausalanalyse bei *Sciara coprophila* 146—166  
 MONTGOMERY, T. H. 104  
 MORINAGA, T. 191, 205  
 MORRISON, J. H. 317  
 MORRISON, J. W. 297—309 (M. and RAJHATHY: Chromosome behaviour in autotetraploid cereals and grasses)  
 Mosaiktiere bei *Solenobia* 70, 71, 73  
 MOSES, M. J. 313  
 MOUTSCHEN-DAHMEN, J. 322  
 MÜNTZING, A. 12, 297, 298, 306, 310, 448, 523, 545—547  
 MULDAL, S. 365, 376  
 Multivalente bei *Brassica* 212, 215—218  
*Mus* 433, 487, 490, 492  
 Mutagene Substanzen s. Äthylalkohol, Maleinsäurehydrazid, Myleran, Stickstofflost  
*Mycophila speyeri* 402—418  
 MYERS, M. W. 302, 303, 306  
 Myleran, mutagene Wirkung auf Wurzelspitzen von *Vicia* 573—576, 578—580
- NABOURS, R. K. 433  
 Nährzellkernchromosomen von *Calliphora* 335—364  
 NAKAHARA, K. 201  
 NARBEL, M. 77, 94, 375  
 NARBEL-HOFSTETTER, M. 94—96  
*Narcissus* 543  
 NAVASCHIN, M. 263  
 NAYLOR, J. M. 344, 361, 553, 563, 564  
 NEARY, G. J. 314  
 NELSON, R. 191, 192
- Nematocera* 264  
*Nemeritis* 95  
*Neobromus* 167  
 Neo-Centromeren-Aktivität 173, 197, 310—312  
*Neodine* 125  
 — *macraspis* 105  
 — —, Harlekinmeiose 115—117  
 NEWCOMER, E. H. 484, 485, 487, 490, 494, 495  
 NICKLAS, R. B. 125, 402—418 (Chromosome cycle of *Mycophila*)  
*Nicotiana tabacum*, DNS-Synthese und Mitose 553—571  
 NIELSEN, C. O. 365, 366, 368  
 NIKOLEI, E. 403  
 NISHIYAMA, I. 298  
 Non-Disjunction 152—165, 456, 457, 459, 460  
 NOWEL, P. C. 514  
 Nucleolus bei *Brassica* 210, 211, 213  
 — bei *Calliphora* (Nährzellen) 352, 353  
 — bei *Chironomus tentans* und *pallidivittatus* (Bedeutung als Zellbestandteil) 265—269  
 NYGREN, A. 545, 547
- OCKEY, C. H. 330  
 O'CONNOR, F. B. 365, 366, 375  
 OEHLKERS, F. 208, 456  
*Oenothera* 460, 461, 543  
 ÖSTERGREN, G. 12, 191, 196, 543, 545, 547  
 OGUMA, K. 494  
 OHNO, S. 474, 484—498 (Sex chromosomes and microchromosomes of *Galilus*)  
 OKABE, S. 193  
*Oligarces* (s. a. *Heteropeza*) 402  
*Oligochaeta* 365—379  
*Oligotrophini* 415  
*Oligotrophus* 415  
 OLSSON, G. 221, 222  
 OMAN, P. W. 246  
 OMODEO, P. 365, 376  
 Oogenese von *Acanthocyclops robustus* 425, 426  
 — von *Eucyclops serrulatus* 428—430  
 — von *Gallus domesticus* 492, 493  
 — von *Limnophyes biverticillatus* 382 bis 385, 397—400  
 — — — *virgo* 385—388, 397—400

- Oogenese von *Lumbricillus* (diploide Form) 366—368  
 — — — (triploide Form) 368—373  
 — von *Macrocylops fuscus* 427, 428  
 — von *Megacylops viridis* 420—425  
 — von *Mycophila* 405, 409—411  
 — von Orthocladinen 380—401  
 — von *Pseudosmittia arenaria* 388—393, 397—400  
 — — — *baueri* 393—395, 397—400  
*Oryza* 191  
 OSTER, I. I. 573  
 OTA 201  
 OWCZARZAK, A. 563
- Pachytänstruktur 257  
 — bei *Brassica* 205—228  
 Paedogenese 403  
*Paonia* 453  
*Panicum* 545  
 PAO, W. K. 306  
*Paracyclops* 430  
 PARDI, L. 68, 83  
*Paris* 543  
 PARTHASARATHY, N. 297  
*Parthenium* 543, 546  
 Parthenogenese (s. a. Paedogenese) 416  
 — bei *Lumbricillus* 365, 375—378  
 — bei Orthocladinen 380—401  
 — bei *Solenobia* 29—102  
 Partialspindeln 173, 191, 192, 197, 199  
 PASTOR, J. B. 433, 436, 437, 440  
 PATAU, K. 553—572 (P. and DAS:  
 Relation of DNA synthesis and mitosis  
 in tobacco pith tissue)  
 PAVAN, C. 129, 346, 563  
 PEASE, D. C. 191  
 PEASE, M. S. 206  
 PELC, S. R. 11, 25—28  
 PELLING, C. 291  
 PENROSE, L. S. 514  
*Pentatomidae* 255, 260  
 —, Chromosomenzahl 106  
 —, Harlekinmeiose 108—127  
 —, normale Meiose 106—108  
*Pentatomini* 104, 105, 119—123  
 PERRO, J. L. 257  
 PERRY, R. P. 288  
 PERSIDSKY, M. D. 197  
 PETO, F. H. 306  
*Phleum* 546  
 Photometrie bei *Cicadellidae* 254—256
- Photometrie bei *Nicotiana* 553—571  
*Phytophaga* 415  
*Pisum* 475  
 — *sativum*, Tetraploidisierung des Meristems 313—321  
*Plantago* 546  
 PLESSERS, A. G. 301  
*Poa* 545, 547  
 POLANI, P. E. 514  
 Poldeterminanten 192, 193, 198, 199  
 POLLISTER, A. W. 193, 197  
 POLLISTER, P. F. 193, 197  
*Polycelis* 545—547  
*Polygonum* 500  
 Polynemie 360, 361  
 Polyploidie 56—58, 82—90, 214, 247, 368—378, 553—571  
 Polyspermie 68, 69, 75, 76, 127  
 Polytänchromosomen 263—296, 335—364  
 Polytänie 257, 259—261, 357—359  
 POMERAT, C. M. 514  
 POND, V. 10, 229, 235, 313, 546  
 Präparationstechnik und Chromosomenmorphologie 514—522  
 FRANKEN, R. 303, 310, 442, 453  
 Preferential segregation s. Reduktion, gerichtete  
 PRICE, J. M. 553, 564  
*Primula* 433  
 PRITCHARD, A. E. 402, 403, 414  
*Prodiamesa olivacea* 352  
 Prometaphasestreckung 8, 409, 410  
 Prophase, relative Dauer bei *Bromus*-Bastarden 168—171, 194, 195  
*Pseudoeoplitus longirostris* 105  
 — —, Harlekinmeiose 119—121  
 Pseudofertilisation 375  
*Pseudosmittia arenaria* 381, 382, 388—393  
 — *baueri* 381  
 — —, Chromosomenzahl 393  
 — —, Oogenese 393—395  
*Psychidae* 29—102  
 PUCHTA, O. 32, 77  
 PUCK, T. T. 514, 521  
 Puffbildung bei *Calliphora* 352  
 — nach Transplantation bei *Drosophila* 129—145
- RAJHATHY, T. 297—309 (MORRISON and R.: Chromosome behaviour in autotetraploid cereals and grasses)  
 RAMANUJAM, S. 221, 222, 297

- RANDOLPH, L.F. 297, 302, 306, 307, 545  
 RASCH, E.M. 357  
*Rattus* 433, 485, 490, 492, 495  
 — *norvegicus*, Chromosomen-Präparationstechnik 514—522  
 READ, J. 578  
 REDDY, V.R. 544, 547  
 Reduktion, gerichtete 274, 422—424  
 —, somatische 558, 566  
 Reduplikation (s. a. DNS-Synthese), des Kinetochors in Polytänochrosomen 348  
 REES, H. 10, 12, 13, 16, 303, 310, 376, 448  
 REESE, G. 543, 545, 546  
 REITBERGER, A. 322, 323, 402, 405, 413, 415  
 REKEMEYER, M.L. 288  
 REMMERT, H. 381  
 RENNER, O. 460, 461  
 REVELL, S.H. 15, 16, 330, 573, 577  
 REYNOLDS, S.R.M. 165  
*Rhabdophaga batatas*, Chromosomensatz 500, 501  
 — —, Spermatogenese 499—513  
 RHOADES, M.M. 310  
*Rhoeo* 23, 564  
 — *discolor*, Meiose in den EMZ 456—458  
 — —, Sterilität 458—460  
*Rhopalomyia* 415  
 RICHARDSON, M.M. 376  
 RICHARIA, R.H. 219, 220, 223, 224  
 Richtungskopulationskern 54, 55, 59—66, 73, 75, 76, 78—80, 82, 88, 94—98  
 RIDLER, M. 514  
 RIEGER, R. 222, 573—581 (R. und MICHAELIS: Wurzelwachstum und Sensibilität gegenüber Radiomimetica bei *Vicia faba*)  
 Riesenchromosomen (s. a. Polytänochrosomen, Speicheldrüsenchromosomen), sekundäre 339—355  
 RIS, H. 11, 42, 256, 508  
 RNS 125, 289—293  
 — Elimination bei *Solenobia* 41, 42  
 ROBERTSON, W.R.B. 302  
 RÖBBELEN, C. 205—228 (Analyse des *Brassica*-Genoms)  
 ROBINSON, A. 514  
 Röntgenbestrahlung, Chromatid- und Subchromatid-Rekombinationen 229—244  
 RØJLE, N.C. 366  
 ROMAN, H. 292  
 ROSSI, A. 322, 330  
 ROTHELS, K.H. 361, 521  
 ROTTS, H. 474  
*Rubiaceae* 453  
 RUCKES, H. 105  
 RUDKIN, G.T. 344, 361, 563  
 RÜSCH, M.E. 419—432 (Untersuchungen über Geschlechtsbestimmungsmechanismen bei Copepoden)  
 RUTISHAUER, A. 10, 12, 545, 546  
 SAKAMURA, T. 191  
*Salix* 191  
 SARGANT, E. 434, 436  
 SASAKI, M. 514—522 (Modification in size and shape of chromosomes due to technical procedure)  
 Satellit, bei *Brassica* 210, 211, 213  
 SAX, K. 229, 459, 460, 573  
 SCHAEFFER, K. 29—102, 376  
 SCHERBAUM, O. 313  
 SCHIEMANN, H. 545  
 SCHNEIDER, J. 523, 526, 530, 536  
 SCHOLES, M.E. 578  
 SCHOLL, H. 380—401 (Oogenese parthenogenetischer Orthocladinen)  
 SCHRADER, F. 108—228 (Aberrant chromosome behavior in *Peniatomidae*), 245, 247, 255, 260, 360, 508  
*Schraderia cinctus* 105—107  
 — —, Harlekinmeiose 108—111, 123, 124  
 — *hughesae* 105  
 — —, Harlekinmeiose 108—111, 123, 124  
 SCHULTZ, J. 337  
 SCHWEMMLE, J. 461  
*Sciara* 146, 377, 505, 509, 510, 512  
 — *coprophila*, Einfluß von X-Translokationen auf die Geschlechtsbestimmung 146—166  
*Sciaridae* 380  
*Scilla* 12, 376, 543  
 SCOTT, A.C. 509  
 SEARS, E.R. 543  
*Secale* 10, 12, 16, 257, 310, 441, 544, 546, 547, 563  
 — *cereale* 441, 445  
 — —, Chiasmafrequenz 446—449, 452 bis 454

- SEILER, J. 29—102 (Analyse der diploid parthenogenetischen *Solenobia*), 376  
 Sekundärpaarung bei *Brassica* 216—218, 220, 222—224  
 SHAPIRO, A. 514  
 SHAW, G. W. 12, 482, 548  
 SHIBATA, K. 222  
 SHIMAMURA 201  
 SIEBS, W. 292, 293  
 SIKKA, S. M. 220, 223  
 SIMINOVITCH, L. 521  
 SIRLIN, J. L. 337  
 SIROTINA, M. I. 133  
 SKOOG, F. 554, 556, 558, 559, 562, 564, 565, 567  
 SLIZYNSKI, B. M. 490  
 SMITH, S. G. 288  
 SMITH, W. E. 306  
*Smittia spec.* 381  
 — —, Chromosomenzahl 395  
 — —, Oogenese 395—397  
 SNOAD, B. 25  
 SOKOLOV, N. N. 484, 494  
*Solenobia* 77, 94, 95, 375, 376  
 — *triquetrella*, bisexueller Karyotyp 30, 32, 33, 41, 42, 73—82  
 — —, Chromosomenzahl 41  
 — —, Embryonalentwicklung, normale 55—66  
 — —, —, nach Befruchtung 66—73  
 — —, Männchen 39  
 — —, Meiose 41—55, 65  
 — —, parthenogenetischer Karyotyp 29 bis 102  
 — —, parthenogenetische ♀♀ × bi-sexuelle ♂♂  
 — —, tetraploid parthenogenetischer Karyotyp 32—34, 42, 82—90  
 — —, Y-Chromosomen, überzählige 90 bis 94  
 SONBATTI, E. M. 573  
 Sondernucleolen 265, 269, 282, 283, 292  
*Sorghum* 544—546  
 SPARROW, A. H. 229—244 (WILSON and S.: Configurations resulting from isochromatid and iso-subchromatid union), 573  
 SPARROW, R. C. 313, 546  
 Speicheldrüsenchromosomen bei *Drosophila* nach Explantation 129—145  
 — bei Orthocladinen 382, 385, 388 bis 390, 395, 398  
 Speicheldrüsenchromosomen bei *Sciara* 153—165  
 Spermatogenese bei Cyclopiden 424, 428, 429  
 — bei *Gallus* 489—492  
 — bei *Lumbricillus* 368, 373—375  
 — bei *Mycophila* 412  
 — bei *Pentatomidae*, aberrante in Harlekinschläuchen 108—127  
 — — —, normale 106—108  
 — bei *Rhabdophaga* 499—513  
*Sphaerocarpus donnellii*, mutagene Wirkung von Maleinsäurehydrazid 322 bis 334  
 Spindel bei *Lumbricillus* 368—378  
 —, monopolare 499, 508—511  
 — bei *Rhabdophaga* 499—513  
 —, multipolare 83, 173—181, 185, 190 bis 192, 196, 198—201  
 Spindelfaseransatzstelle s. Kinetochor  
 Spindelorganisatoren 192, 193, 198, 199  
 SRINIVASACHAR, D. 222, 564  
 SRIVASTAVA, M. D. L. 111  
 STADLER, L. J. 433  
 STÄLFELT, M. G. 474, 475  
 STALKER, H. D. 95  
*Stauroderus* 10  
 STEBBINS, G. L. 297, 416  
 STEELE, R. 573  
 STEINITZ, L. M. 570  
 STELLA, R. 424  
 Sterilität bei *Rhoeo* 458—461  
*Sternorrhyncha* 261  
 STICH, H. F. 344, 361  
 Stickiness 7, 111—124  
 Stickstofflost, mutagene Wirkung auf Wurzelspitzen von *Vicia* 573—576, 578—580  
 STRASBURGER, E. 336  
 STRENKE, K. 381, 388  
*Strongylocephalus* 254, 260  
 Strukturheterozygotie in natürlichen Populationen parthenogenetischer Orthocladinen 382, 389, 390  
 Sub-Chromatiden 10—16, 235—239  
 SUOMALAINEN, E. 375, 378, 397  
 SUZUKI, K. 489, 494  
 SWAMINATHAN, M. S. 297  
 SWANSON, C. P. 191, 192, 239, 302, 357, 461, 548  
 SWIFT, H. 357, 564, 569

- SYBENGA, J. 441—455 (Non-random distribution of chiasmata in rye, *Crotalaria* and coffee)
- SZYBALSKA, W. 313
- Tagesrhythmus der Mitoseaktivität 467, 468, 473—476
- TAKEDA, N. 419, 431
- Taxomyia* 415, 506
- TAYLOR, E. W. 500
- TAYLOR, J. H. 290, 313, 563
- Tegenaria* 16
- Teilungsphasen, Dauer bei *Bromus-Bastarden* 168—171, 194, 195
- , — bei Copepoden 421
- Telophase bei *Bromus-Bastarden* 168 bis 171, 194, 195
- Tetrahymena* 313
- Tetraploidie 313—321, 376
- THERMAN, E. 191, 192
- Thermobia* 257
- THIENEMANN, A. 380
- THODAY, J. M. 15
- THOMAS, C. A. 403
- THOMAS, P. T. 545—547
- THOMPSON, J. B. 10
- THOMPSON, K. F. 221
- THOMSEN, M. 376
- Thyanta* 260
- Thymidin, tritium-markiertes 554—570
- Thysanura* 257
- Tigriopus* 419, 431
- TIMONEN, S. 191, 192
- TINIakov, G. G. 494
- TISCHLER, G. 523
- TJO, J. H. 514, 521
- TONKINSON, S. M. 314
- Tradescantia* 191, 201, 241, 543, 553, 564, 567
- Translokationen des X bei *Sciara* 146—166
- Trialeurodes* 376
- Trichocladus* 399
- Trillium* 10—12, 241, 543, 546
- *erectum* 229—244
- Triploidie bei *Limnophyes virgo* 385
- bei *Lumbricillus* 365, 366, 368—378
- Triphormomyia* 415
- Triticum* 14
- Triton* 191, 192
- Triturus* 507
- TROEDSSON, P. H. 126
- TROFIMOW, J. E. 494
- Truxalinae* 2
- TSCHERMAK-WOESS, E. 21, 25—28 (Einbau von H<sup>3</sup>-Thymidin und Endomitotätigkeit bei *Vicia faba*), 360, 456, 458, 460, 545
- TSUCHIYA, T. 306
- Tubifex* 376
- Tubificidae* 376
- Tulipa* 434
- Tumor und Spindelanomalien 191, 192
- TURPIN, R. 514
- UBBELS, G. A. 494
- Ulopa reticulata* 246—248, 250, 251, 253, 254, 257, 260
- , —, Chromosomenzahl 253
- Ulopinæ* 246, 261
- ULRICH, H. 403
- UNGER, H. 494
- Union s. Rekombination
- Univalente 409, 410, 412
- bei *Bromus*-Artbastarden 169, 192, 196
- , X von *Chorthippus* 3
- bei Copepoden 426, 429
- bei *Lumbricillus* (triploide parthenogenetische Form) 368—371, 375—377
- bei Orthocladiniiden 382, 387, 390, 398, 399
- bei *Pentatomidae* 110—123
- UPCOTT, M. B. 10, 545, 547
- Uracil 322
- URETZ, R. B. 507
- VAARAMA, A. 543
- VAN'T-HOF, J. 313—321 (V.-H., WILSON and COLON: Control of mitotic activity)
- VERMUND, H. 553, 564
- Vicia* 191, 322, 330, 331
- *faba*, Variabilität der Mitosehäufigkeit 463—478
- , —, Wurzelwachstum und Sensibilität gegenüber mutagenen Substanzen 573—580
- VILKOMERSON, H. 310
- VINCENT, W. S. 288—291



- Wachstum und Nucleolus 289, 290  
*Wachtliella persicariae* 500, 503, 505, 506, 508  
 WAKONIG, T. 12  
 WALSH, M. P. 191  
 WALTERS, J. L. 10  
 WALTERS, M. S. 167—204 (Rate of meiotic spindle irregularities and microspore division in *Bromus tritici* × *B. carinatus*), 310  
 WEBER, H. 106  
 WHITE, M. J. D. 3, 10, 358, 359, 375, 380, 402, 404, 413, 415, 489, 499, 506, 507, 523  
 WILSON, E. B. 106, 377, 405, 433, 434, 440  
 WILSON, G. B. 10, 11, 229—244 (W. and SPARROW: Configurations resulting from iso-chromatid and iso-subchromatid unions), 313—321 (VAN'T-HOF, W., and COLON: Control of mitotic activity)  
 WILSON, J. Y. 433—440 (Chiasma frequency in the two sex mother-cells of a hermaphrodite)  
 WINKLER, H. 27  
 WINTON, D. DE 433  
 WITKUS, E. R. 523  
 WÖHRMANN, K. 544  
 WOLF, E. 346, 359—362  
 WOODS, P. S. 290  
 WYLLIE, A. D. 523  
  
*Xanthisma* 543, 545  
*Xenopus* 288  
*Xerophloea viridis* 245—261  
 —, Chromosomenzahl 253  
 —, DNS-Photometrie 254—256, 259 bis 261  
 —, Meiose 247—254  
  
 YAMAHA, G. 191  
 YAMASAKI, N. 478—483 (Differentielle Färbbarkeit der Chromosomen von *Cypripedium* nach DNase-Behandlung)  
 YAMASHINA, Y. 484, 487, 494  
 YAMASHITA 298  
 YARNELL, S. H. 205, 222  
 YATES, H. B. 465  
  
 Zahl der Chromosomen von *Acanthocyclops robustus* 425  
 — — — — — *vernalis* 426  
 — — — — — *Calliphora erythrocephala* 336  
 — — — — — *Eucyclops serrulatus* 428  
 — — — — — *Gallus domesticus* 484—498  
 — — — — — *Graphocephala coccinea* 253  
 — — — — — *Limnophyes biverticillatus* 382  
 — — — — — *virgo* 385  
 — — — — — *Lumbricillus lineatus* 366, 368  
 — — — — — *Macrocyclus fuscus* 427  
 — — — — — *Megacyclus viridis* 420  
 — — — — — *Pentatomidae* 106  
 — — — — — *Pseudosmittia arenaria* 388 bis 390  
 — — — — — *baueri* 393  
 — — — — — *Rhabdophaga batatas* 500, 501  
 — — — — — *Smittia* spec. 395  
 — — — — — *Solenobia triquetrella* 41  
 — — — — — *Ulopa reticulata* 253  
  
*Zea* 191, 310, 376, 433, 543, 544, 546, 547  
 Zellfusion 123  
 Zellplattenbildung 200, 201  
 ZEUTHEN, E. 313  
 ZILLINSKY, F. J. 298  
 ZINECKER-BRAUER, J. 463—478 (HARTE und Z.-B.: Variabilität der Mitosehäufigkeit bei *Vicia faba*)  
 ZIRKLE, R. E. 507

